

# **Univerzita Karlova**

## **Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Lenka Zachardová**

Mechanismy potenciálního toxického působení bisfenolu A na endokrinní systém

Mechanisms of potential toxic effects of bisphenol A on the endocrine system

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2020

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala především svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za veškeré rady, vstřícnost a ochotu, které mi při zpracování mé bakalářské práce věnoval a také svým rodičům za podporu během celého studia.

## **Prohlášení autorky práce**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Plzni, 20. 12. 2020

Podpis:

## ABSTRAKT

Bisfenol A (BPA) je používán v chemickém průmyslu už několik desítek let. Za tu dobu se nastřádalo množství *in vitro* a *in vivo* výzkumů shrnující molekulární mechanismy BPA narušující endokrinní rovnováhu v nejrůznějších biologických modelech. Do organismu proniká z vnějšího prostředí, ale zejména konzumací potravin a tekutin, které jsou v kontaktu s materiály obsahující zmíněný xenoestrogen. Hydroxylová skupina na fenolovém kruhu BPA umožňuje navázání na transmembránové estrogenové receptory spřažené s G-proteiny a řadu nukleárních receptorů ovlivňující hormonální systém a mající za následek alteraci v signálních kaskádách. Navozuje oxidativní stres a narušuje funkci regulačních faktorů na genové, buněčné i tkáňové úrovni. Disruptivní účinky BPA jsou asociovány s poruchami ve vývojovém, reprodukčním, kardiovaskulárním, imunitním a neurologickém systému. Tato práce má za cíl shrnout dosavadní poznatky o molekulárních mechanismech toxicity BPA v endokrinním systému převážně s použitím modelu *Mus musculus*.

**Klíčová slova:** BPA, endokrinní systém, nukleární receptory, GPER, oxidativní stres.

## ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) has already been used in the chemical industry for several decades. Since that time, a huge amount of *in vitro* and *in vivo* studies have been accumulated summarizing the molecular mechanisms of BPA causing disruption in endocrine homeostasis in all kinds of biological models. It enters the body from external environment; however, the main source of penetration is through consumption of food and liquids that are in contact with materials containing the mentioned xenoestrogen. The hydroxyl group within BPA phenol ring enables binding to transmembrane G-protein-coupled estrogen receptors and a number of nuclear receptors affecting hormonal system and resulting in alterations in signalling pathways. BPA induces oxidative stress and interferes with regulation factors functions at gene, cell and tissue level. Disruptive effects are associated with developmental, reproductive, cardiovascular, immune and neurobiological disorders. This thesis is aiming to sum up existing findings about the molecular mechanisms of BPA toxicity in the endocrine system mainly using *Mus musculus* model.

**Keywords:** BPA, endocrine system, nuclear receptors, GPER, oxidative stress.

## Seznam zkratek

**5-HT** 5-hydroxytryptamin, serotonin

**Ach** acetylcholin

**Akt** protein kináza B

**ALA**  $\alpha$ -lipoová kyselina

**ALT** alaninaminotransferáza

**AMPA**  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4  
isoxazolepropionová kyselina

**AP-1** aktivátorový protein 1

**AR** androgenní receptor

**Asn** asparagin

**AST** aspartát transamináza

**ATF**  $\alpha$ -tokoferol

**ATP** adenintrifosfát

**Bad** agonista buněčné smrti spojený s Bcl-2

**Bcl-2** B-lymfom 2

**BPA** bisfenol A

**BPA-diF** bisfenol A difluor

**BPA-monoF** bisfenol A monofluor

**BPAF** bisfenol AF

**BPB** bisfenol B

**BPE** bisfenol E

**BPF** bisfenol F

**BPS** bisfenol S

**bw** tělesná váha

**CA1** *cornu Ammonis* 1, oblast hipokampu

**cAMP** cyklický adeninmonofosfát

**CAT** kataláza

**CBS** cystathionin  $\beta$ -syntáza

**CNS** centrální nervový systém

**CRE** cAMP responsivní elementy

**CREB** protein vázající cAMP responsivní  
elementy

**CSE** cystathionin  $\gamma$ -lyáza

**cytP450** cytochrom P450

**DAG** diacylglycerol

**DBD** doména vázající se na DNA

**DHT** dihydrotestosteron

**DNA** deoxyribonukleová kyselina

**E2** estradiol

**EDC** endokrinní disruptivní chemikálie

**EGFR** receptor epidermálního růstového  
faktoru

**EPSP** excitační postsynaptický potenciál

**ER** estrogenní receptor

**ER $\alpha$**  estrogenní receptor  $\alpha$

**ER $\beta$**  estrogenní receptor  $\beta$

**ERE** estrogenní responsivní elementy

**Erk** kináza regulovaná extracelulárním  
signálem

**ERR** receptor odvozený od estrogenového  
receptoru

**ERR $\alpha$**  receptor odvozený od estrogenového  
receptoru  $\alpha$

**ERR $\beta$**  receptor odvozený od estrogenového receptoru  $\beta$

**ERR $\gamma$**  receptor odvozený od estrogenového receptoru  $\gamma$

**ERRE** responsivní elementy odvozeného estrogenového receptoru

**F1** první filiální generace

**FAS** syntáza mastných kyselin

**FSH** folikulostimulační hormon

**G $\alpha$**   $\alpha$  podjednotka GPCR

**G $\beta$**   $\beta$  podjednotka GPCR

**G $\gamma$**   $\gamma$  podjednotka GPCR

**G15** inhibitor receptorů spřažených s G-proteiny

**GABA** kyselina  $\gamma$ -aminomáselná

**GF** růstový faktor

**GFR** receptor růstového faktoru

**GGT**  $\gamma$ -glutamyltransferáza

**Glu** kyselina glutamová

**GnRH** gonadotropin uvolňující hormon

**GPCR** receptory spřažené s G-proteiny

**GP $\beta$**  estrogenové receptory spřažené s G-proteiny

**GPR30** receptory spřažené s G-proteiny 30

**GPx** glutathion peroxidáza

**GR** glukokortikoidní receptor

**GSH** glutathion

**GSK-3 $\beta$**  glykogen syntáza kináza 3- $\beta$

**HPG** hypothalamo-hypofyzární-gonadální systém

**HPP** hydroxyfenyl propan

**hPXR** lidský pregnan X receptor

**ICI** inhibitor estrogenového receptoru

**IGF-1** inzulinu podobný růstový faktor 1

**IL-1 $\beta$**  interleukin 1 $\beta$

**IL-10** interleukin 10

**Ile** izoleucin

**IP3** inositoltrifosfát

**IVF** *in vitro* fertilizace

**JAK** Janusovy kinázy

**JAK2** Janusova kináza 2

**LBD** doména vázající se na ligand

**LBP** kapsa vázající ligand

**Leu** leucin

**LH** luteinizační hormon

**LPL** lipoprotein lipáza

**LTP** dlouhodobá potenciace

**MAPK** mitogenem aktivované proteinkinázy

**MDA** malondialdehyd

**MDM2** myší dvouminutový homolog 2

**MEK** mitogenem aktivovaná protein kináza kináza

**MMP** matrix metalloproteináza

**mPXR** myší pregnan X receptor

**mRNA** mitochondriální ribonukleová kyselina

**MTOC** mikrotubuly organizující centrum

**NCoR** korepresor jaderného receptoru

**nER** nukleární estrogenní receptor

**NF- $\kappa$ B** nukleární faktor kappa B

**NMDA** N-methyl-D-aspartát

**P21** inhibitor cyklin-dependentní kinázy

**P27** inhibitor cyklin-dependentní kinázy

**P53** nádorový protein 53

**p-CREB** fosforylovaný CREB

**p-ERK** fosforylovaná Erk

**PI3K** fosfatidylinositol-3-kináza

**PIP2** fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát

**PKA** proteinkináza A

**PKA-C** katalytická podjednotka PKA

**PKA-RC** regulační podjednotka PKA

**PKC** proteinkináza C

**PLC** fosfolipáza C

**Pol II** polymeráza II

**PPAR $\gamma$**  receptor aktivovaný proliferátorem  
peroxisomu subtypu  $\gamma$

**PR** progesteronový receptor

**PRE** progesteronové responsivní elementy

**PTEN** homolog fosfatázy a tenzinu

**PVC** polyvinylchlorid

**PXR** pregnan X receptor

**RE** responsivní elementy

**ROS** reaktivní kyslíkové radikály

**rPXR** potkaní pregnan X receptor

**RTK** tyrosinkinázový receptor

**SCD-1** stearoyl-CoA desaturáza

**SMRT** umlčující mediátor receptoru hormonu  
štítné žlázy kyseliny retinové

**SOD** superoxid dismutáza

**SOD1** superoxid dismutáza 1

**SOD2** superoxid dismutáza 2

**SP-1** protein specificity 1

**SRC-1** koaktivátor steroidních receptorů-1

**STAT** signální transkripční transduktor a  
aktivátor

**STAT5b** signální transkripční transduktor a  
aktivátor 5b

**T** testosteron

**T3** trijodtyronin

**T4** thyroxin

**TBBPA** tetrabrombisfenol A

**TF** transkripční faktor

**TGF** transformační růstový faktor

**TNF** faktor nádorové nekrózy

**TR** tyrosinový receptor

**TR $\alpha$**  tyrosinový receptor  $\alpha$

**TR $\beta$**  tyrosinový receptor  $\beta$

**TRE** tyrosinové responsivní element

**VGCC** napětově řízený vápníkový kanál

**VSMC** buňky vaskulární hladké svaloviny

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	BPA .....	2
2.1	Obecná charakteristika.....	2
2.2	Syntéza a použití .....	2
3	Genomické mechanismy.....	3
3.1	Estrogenové nukleární receptory .....	3
3.1.1	Receptory ER $\alpha$ a ER $\beta$ .....	3
3.1.2	Receptory ERR.....	4
3.2	Thyroidní receptor .....	6
3.3	Androgenní receptor .....	7
3.4	Progesteronový receptor .....	8
3.5	Pregnan X receptor .....	8
3.6	Glukokortikoidní receptor.....	9
3.7	PPAR $\gamma$ receptor.....	9
4	Negenomické mechanismy.....	10
4.1	Membránový estrogenový receptor GPER .....	10
4.2	Epigeneze .....	12
4.3	Oxidativní stres .....	13
5	Toxické působení BPA.....	14
5.1	Játra.....	14
5.2	Mozek .....	15
5.3	Reprodukční systém.....	16
5.3.1	Samčí reprodukční systém .....	16
5.3.2	Samičí reprodukční systém .....	17
5.4	Vývoj plodu .....	19
6	Akumulace BPA v organismu .....	20
7	Alternativy BPA .....	21
8	Závěr.....	22
9	Seznam literatury.....	24

# 1 Úvod

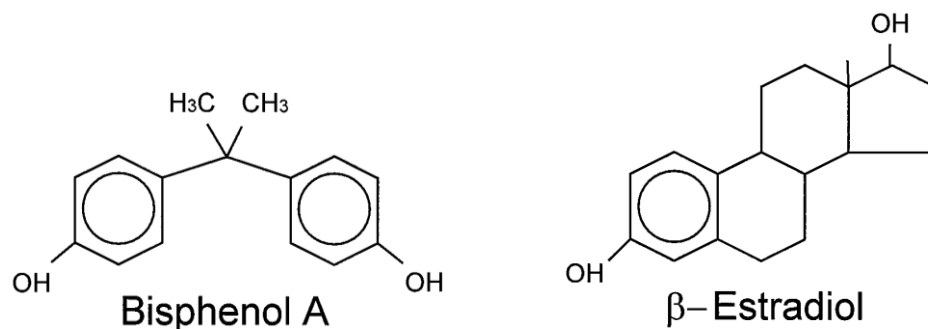
Bisfenol A (BPA) je průmyslově vyráběná organická sloučenina a hlavní komponent výrobků z polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic. Podle Evropské agentury pro chemické látky (ECHA) byl klasifikován jako toxický pro reprodukci a označen jako endokrinní disruptor se škodlivými účinky na lidský organismus a životní prostředí. Celosvětová produkce roste o 6 % každým rokem a díky jeho rozsáhlému využití je jeho globální produkce očekávána na více než 7 milionů tun do roku 2023. Zrod této molekuly se však datuje zpátky o více než sto let až do roku 1891, kdy ji poprvé syntetizoval Aleksandr P. Dianin. Bylo tomu ale až o 45 let později, kdy v roce 1936 Dodds a Lawson společně zaznamenali estrogenní aktivitu BPA po podání 100 mg dávky potkaním samicím. Výsledky byly následně opakovány a BPA se proto měl začít využívat jako syntetizovaný estrogen. V té době ale přišla na svět i další sloučenina diethylstilbestrol (DES), která se při testech prokázala jako látka se silnějšími estrogenními vlastnostmi. Od BPA se z toho důvodu upustilo a zájem o vývoj se přesunul na DES. O něco později se pro BPA objevilo nové využití na trhu jakožto inhibitor polymerace polyvinylchloridu a prekursor pro syntézu zpomalovačů hoření, a tak se v 60. letech 20. století rozjela jeho průmyslová výroba. BPA se stal součástí každodenního života ve formě plastových obalů, kojeneckých lahví, izolačních materiálů či zdravotnických a vědeckých pomůcek. Právě díky používání polykarbonátových baněk při svém výzkumu objevil David Feldman v 90. letech estrogenní charakter BPA. Baňky používal pro kultivaci kvasinkových buněk na růstovém médiu, do kterého se během autoklávování uvolnily monomery BPA, jež se mu následně podařilo izolovat. Později bylo dokázáno, že polymerovaná forma BPA skládající se z jednotlivých molekul, které jsou propojeny esterovými vazbami, skutečně podléhá hydrolýze při vysokých teplotách a BPA je tak schopen se uvolňovat do okolního prostředí. Kromě vysokých teplot působí na jeho rozpad i změna pH a životnost materiálu. Vlivem plastového znečištění byly známky BPA detekovány v půdních sedimentech, vodních tocích, mořích, v ledu ale i v atmosféře, kde ulpívá na prachových částicích. Do našeho organismu se dostává jednak z vnějšího prostředí a potravního řetězce, ale především konzumací potravin uchovávaných v plastových nádobách a konzervách. Je schopen prostoupit buněčné membrány prostřednictvím endokrinních receptorů, skrze hematoencefalickou bariéru a placentu a z toho důvodu je považován za nebezpečnou substanci hlavně během vývoje plodu a krátce po něm. BPA byl historicky vnímán jako slabý environmentální estrogen vzhledem k jeho afinitě interagovat s estrogenními receptory, nejnovější studie však odhalují duální účinky závislé na typu receptoru a koncentraci použité při výzkumech a poukazují na to, že by BPA měl být začít označován za selektivní modulátor. Tato práce má za cíl popsat mechanismy, kterými se BPA dostává do buněk a narušuje tak endokrinní systém na buněčné i tkáňové úrovni.



## 2 BPA

### 2.1 Obecná charakteristika

4,4-dihydroxy-2,2-difenyylpropan nebo-li bisfenol A, zkráceně BPA, je organická sloučenina ze skupiny bisfenolů. Do této skupiny patří i řada jeho analogických sloučenin BPS, BPF, BPAF, TBBPA a další. Obecně se jedná o endokrinní disruptor, látku narušující endokrinní systém a způsobující řadu vývojových, reprodukčních, metabolických, kardiovaskulárních, imunitních a neurologických onemocnění u lidí a zvířat. Díky jeho strukturní podobnosti se  $17\beta$ -estradiolem (Obr. 1) se váže na estrogenový receptor a je proto jedním z mnoha známých xenoestrogenů. Mimo jeho estrogenovou aktivitu má schopnost interagovat i s celou další škálou jaderných receptorů, které jsou zmíněny později v této práci. Kromě jaderných receptorů se dokáže vázat i na transmembránové receptory a celkově ovlivňovat buněčnou signalizaci a transkripční procesy [1, 2].



Obr. 1 Struktura BPA v porovnání s estradiolem [3].

### 2.2 Syntéza a použití

BPA je připravován kondenzací acetonu a fenolu v poměru 3:1 při teplotě 60 °C [4]. Surový BPA se následně zpracovává v chemickém průmyslu pro výrobu polykarbonátů. Syntéza aromatických polykarbonátových materiálů probíhá buď interfaciální nebo tepelnou polymerizací. V případě tepelné polymerizace se používá směs difenyl karbonátu a BPA, zatímco polykarbonáty syntetizované interfaciální polymerizací jsou výsledkem reakce BPA a fosgenu [5]. Vzhledem k toxicitě fosgenu spolu s velkým množstvím katalyzátoru  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  nutného pro reakci a jejich dopadem na životní prostředí se však tato metoda stává kontroverzí ve výrobě chemických materiálů [6]. Tepelná polymerizace naproti tomu využívá pouze minimálního množství katalyzátorů, z nichž nejčastější jsou NaOH a LiOH [5]. Pro upravení fyzikálních vlastností výsledného materiálu se BPA někdy nahrazuje jeho deriváty [I].

Polykarbonátová výroba představuje až 75 % z celkové produkce BPA, 20 % spadá na výrobu epoxidových pryskyřic a část BPA se přidává do PVC materiálů [1]. Výrobky z BPA zahrnují celou škálu produktů od přístrojů používaných v medicíně, stavebnictví nebo jako součást elektroniky až přes

každodenně používané nádoby na jídlo či lahve na pití [II]. Epoxidové pryskyřice se používají zejména na vystýlání plechových konzerv na potraviny pro zamezení kovového zápachu. Přitom tento povrch se ukázal jako nevhodný pro kontakt s potravinami, jelikož BPA se při vyšších teplotách uvolňuje a uniká do jídla [I]. Proto se předpokládá, že právě konzervované potraviny spolu s jídlem a tekutinami podávanými v plastových obalech jsou hlavním zdrojem expozice [7-9].

## **3 Genomické mechanismy**

### **3.1 Estrogenové nukleární receptory**

Vzhledem ke strukturální podobnosti BPA a pohlavního hormonu je nejvíce probádána právě disrupce estrogenového systému. Tento steroidní hormon je zodpovědný především za regulaci hormonální aktivity, správný vývoj reprodukčního systému a navozuje vývin sekundárních pohlavních znaků. Existuje mnoho studií potvrzujících schopnost BPA vázat se na estrogenové receptory a ovlivňovat následnou signalizaci a genovou expresi [10, 11].

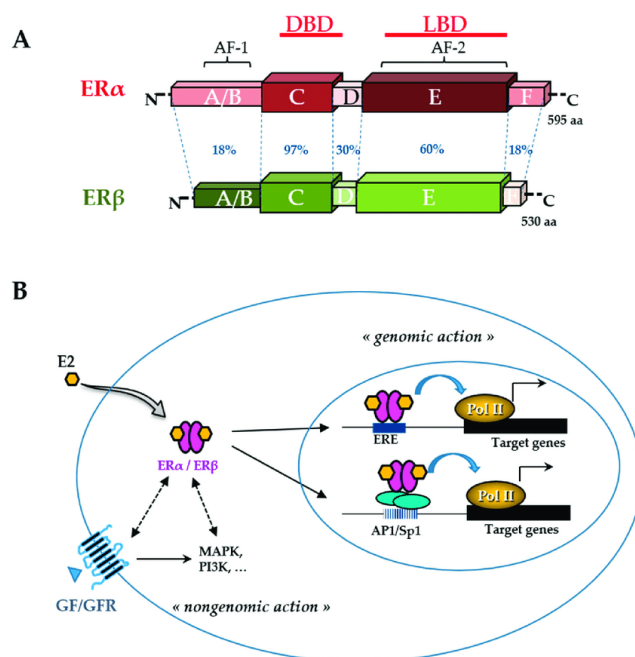
#### **3.1.1 Receptory ER $\alpha$ a ER $\beta$**

ER $\alpha$  a ER $\beta$  jsou receptory z rodiny nukleárních transkripčních faktorů. Klasickým ligandem je estrogen, načež po jeho navázání dochází k aktivaci ERs a jejich dimerizaci s následnou vazbou na ERE po translokaci do buněčného jádra. Tento komplex je schopen vázat další koaktivátory a kostimulanty a působit změny v cílových genech, nejčastěji skrze metylaci či overexpresi nebo downregulaci genové exprese. Mimo cílové geny estrogenové dráhy byl pozorován i vliv toxicity BPA na produkty ERE-genů, proto typy buněk exprimující specifické ERs spolu s komodulačními elementy mohou být citlivější vůči působení endokrinních disruptorů jako je BPA [12, 13].

Obě izoformy ER vykazují značnou homologii především v oblastech kódujících DBD a LBD (Obr. 2). Významně se však odlišují v C-doméně a N-doméně, proto se i předpokládá, že mají jinou funkci [12]. Ta může být příčinou rozličných rušivých účinků BPA vůči ERs. Zatímco vazbou na ER $\beta$  se chová jako agonista, navázáním na ER $\alpha$  byly popsány agonistické i antagonistické účinky [14]. Rovněž při odlišném dávkování vykazuje BPA specifické vlastnosti na buněčné i intracelulární úrovni. Relativní vazebná afinita BPA je přitom až 10 000x nižší než je tomu u 17 $\beta$ -estradiolu, i tak se jeho toxicita ukázala být jako nejvyšší při nano koncentracích, např. ke stimulaci transkripční aktivity obou ERs dochází už při koncentracích v rozmezí 100-1000 nM [15].

Mechanismus navázání BPA na ER je zprostředkován skrze LBD změnou strukturální konformace v helixu 12. Změnou konformace se uvolní nebo zablokuje koaktivační vazebná kapsa. To určuje, zda se BPA bude chovat jako agonista a aktivovat interakci či zda se bude chovat jako antagonist a působit inhibici [12]. Samotná ligace je pak zprostředkována vodíkovými vazbami a van der Waalsovými silami [2]. Estrogen je schopen regulovat i expresi genů postrádajících ERE či jejich

část, a to skrze AP-1/IGF-1 signální transdukce a SP-1/c-FOS a SP-1/TGF signalizace [12] (Obr. 2). Stejně jako estradiol, BPA je schopený regulovat hladiny i těchto faktorů [16-20].



Obr. 2 A – Struktura lidského estrogenního receptoru s naznačenými procentuálními homologiemi mezi typy ERα a ERβ. B – Genomická signalizace ERs zahrnující aktivaci transkripce vazbou na ERE a stimulací AP1/SP1 faktorů [21].

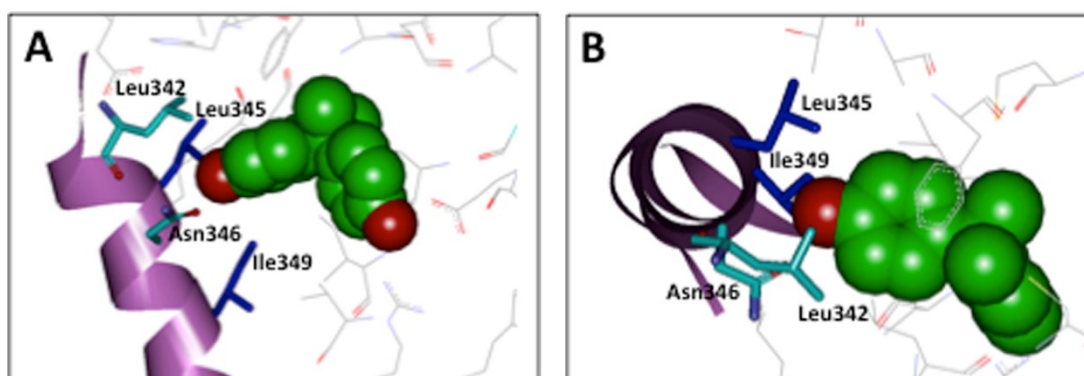
Oba typy receptorů jsou s odlišnou densitou lokalizovány v různých tkáních. Na základě sledování knock-out myši, ERα se vyskytuje hlavně v děloze, mléčných žlázách, hypofýze, kosterním svalstvu, tukové tkáni a kostech. Oproti tomu ERβ receptory převládají ve vaječníku, prostatě, plicích a v kardiovaskulárním a centrálním nervovém systému. Distribuce obou typů se přitom může lišit i v rámci jedné tkáně jako je to například v granulozních buňkách, kde má výraznější zastoupení ERβ a v Theca buňkách, kde dominuje ERα [13, 22, 23]. Mimikováním estradiolu skrze estrogenní signalizaci tak dokáže BPA narušit rozsáhlé množství mechanismů distribuovaných napříč jednotlivými orgány.

### 3.1.2 Receptory ERR

Podskupinou z rodiny estrogenních receptorů jsou i tzv. estrogen-related receptory (ERR), které jsou podobně jako ERs transkripčními regulátory. Subtypy ERRα, ERRβ a ERRγ jsou si strukturně velmi blízké s ERs a podobají se jak ve své aminové sekvenci, tak i v DBD a LBD a stejně jako ERs vážou jaderné transkripční elementy. Navzájem se ale liší ve schopnosti vázat estradiol, a proto se liší i afinita BPA vůči ERRs. Díky schopnosti ERRs vytvářet komplex ERR-ERE však může docházet ke crosstalku mezi signalizacemi ERR a ER a ovlivňovat tak nepřímo expresi genů ERs [24]. Dojde-li

simultánně k vazbě komplexu BPA-ERR $\gamma$  a E2-ER $\alpha$  na ERE, pak spolu vytváří heterodimer a buďto dochází k narušení či kooperaci v regulaci celkové estrogenní buněčné aktivity. Tento potenciální crosstalk mezi ERR $\gamma$  a ER $\alpha$  systémy by mohl vysvětlit některou z estrogenních aktivit BPA [25].

Zatímco BPA nevyvolává změny v expresi ERR $\alpha$  a ERR $\beta$  genů [26], několik studií potvrzuje silnou afinitu vůči izoformě ERR $\gamma$ . ERR $\gamma$  se hojně nachází ve fetálním mozku a placentě a zdá se být důležitou součástí perinatálního vývoje. Proto schopnost BPA vázat se na ERR $\gamma$  vyvolává obavy z možnosti narušení endokrinního systému zejména u plodu, novorozenců a dětí [27, 28]. Podobně jako u ER, BPA interaguje s ERR $\gamma$  za účelem vytvoření komplexu BPA-ERR $\gamma$ , který se následně svou DNA doménou váže na ERRE a poté moduluje transkripci. Ukázalo se, že komplex BPA-ERR $\gamma$  vykazuje stejné vlastnosti jako samostatný ERR $\gamma$ . Stimulace BPA-ERR $\gamma$ -ERRE transdukce se rovněž významně nelišila od přirozeného komplexu ERR $\gamma$ -ERRE, a proto se předpokládalo, že BPA nepůsobí výrazné změny v konformaci receptoru [25]. Z krystalové struktury byly však pozorovány změny v helixu 7 v LBD zahrnující mutace na pozicích Leu342, Leu345, Ile349 a Asn346 poukazující na patrné změny v konformaci při interakci s BPA [28] (Obr. 3). Právě mutace v místě Asn346 se spolu s OH skupinou B-fenolového kruhu BPA ukázala být pro navázání klíčová [27, 28].



Obr. 3 Naznačené 3D schéma interakce BPA s aminokyselinami v helixu 7 v LBD receptoru ERR $\gamma$ . A: pohled ze strany, B: pohled shora [29].

Schopnost těsné interakce demonstrována metodou krystalografie poukázala na schopnost BPA vázat se do kapsy ERR $\gamma$  s minimální energií a bez sterickeho bránění [27]. Zdá se tedy, že tyto hydrogenní vazby, podobně jako tomu je u ERs, jsou pravděpodobně důvodem těsného navázání BPA do vazebné kapsy. Relativní vazebná afinita BPA pro ERR $\gamma$  byla naměřena již při koncentraci 13,1 nM, přičemž u ER $\alpha$  odpovídá koncentraci 1 040 nM a pro ER $\beta$  1 320 nM [25]. V porovnání s ERs se proto BPA váže na ERR $\gamma$  podstatně silnějšími interakcemi. I přes to, že vazebná afinita BPA vůči ERR $\gamma$  je silnější než je tomu u ER $\alpha$ , nedochází po interakci BPA s receptorem ERR $\gamma$  ke změně transkripční aktivity [25]. Předpokládá se tedy, že pro udržení vysoké transkripční aktivity inhibuje BPA navázání

inverzních antagonistů na  $ERR\gamma$ . Také strukturní velikost BPA nahrává tomuto xenoestrogenu a představuje zásadní roli pro navázání. Studie porovnávající BPA a jeho deriváty poukázala na míru halogenace ve vztahu k vazbě do LBP, kde většina halogenových forem BPA vzhledem k velikosti jejich atomů vykazovala nižší vazebnou afinitu [30].

### 3.2 Thyroidní receptor

Thyroidní transdukce zprostředkována TR reguluje hladiny thyroxinu a trijodthyroninu, hormonů štítné žlázy, které jsou důležité pro udržení rovnováhy bazálního metabolismu, správnou funkci mozku během dospělosti i během vývoje, ale ze všeho nejvíce jsou nezbytné při regulaci diferenciace buněk během postembryonického vývoje [31, 32]. Na rozdíl od ostatních nukleárních receptorů, TR se váže na DNA jako homodimer i jako heterodimer. Při umlčování genů je schopen se vázat na TRE i bez aktivace ligandem. K tomu využívá korepresor, se kterým následně jako heterodimer alteruje genovou expresi cílových genů. Předpokládá se přitom, že tvorba heterodimeru zesiluje afinitu vůči DNA díky zvýšené specifitě určené mezerou mezi molekulami heterodimeru [33]. Jakmile se ale naváže thyroidní hormon, korepresor se uvolní a dojde ke změně konformace TR rozpadnutím homodimeru na dva monomery. TR monomer následně váže TRE spolu s koaktivátorem a dochází k zesílení transkripce [33-35]. BPA je schopen indukovat navázání koaktivátoru na subtyp  $TR\beta$ , což je spolu s uvolněním represoru důležitý krok pro aktivaci T3 signalizace. V absenci T3 se BPA následně chová jako agonista thyroidní signalizace, kdežto v přítomnosti thyroidního hormonu byly pozorovány duální účinky (agonista i antagonist) [36]. Existuje několik izoform TRs, z nichž nejvíce zastoupené jsou typy  $TR\alpha$  a  $TR\beta$ . Jednotlivé izoformy u lidí, potkanů a myší vykazují značnou homologii, díky čemuž se studie na zvířatech dají do jisté míry zohlednit právě na lidský TR [34, 37].

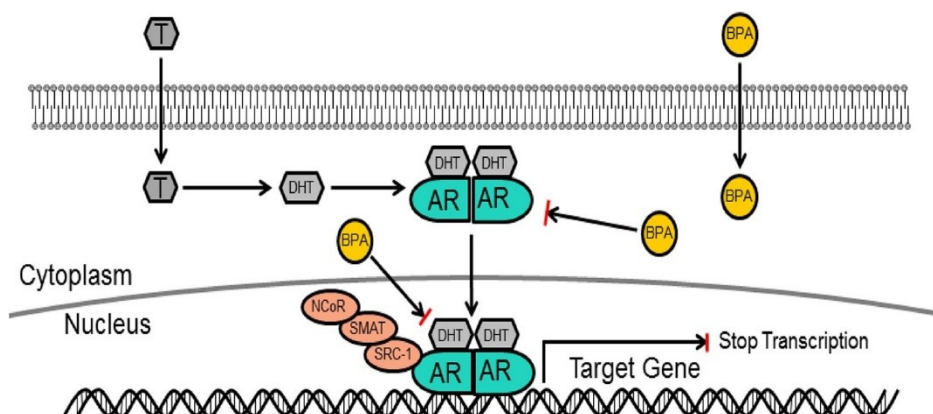
Vzhledem k podobnosti struktur BPA s T3 a T4 [38] byly předloženy studie *in vivo* i *in vitro* demonstrující schopnost BPA konkurovat thyroidním hormonům v navázání se na TR a alterovat genovou expresi thyroidních cílových genů [36, 38]. Podobně jako tomu je u ERs, BPA se váže do LBD polárními a hydrofobními vazbami a následně je ligace stabilizována hydrogenními vazbami. Právě H-vazby spolu s tvorbou solných můstků jsou při expozici BPA prostředníky narušení thyroidní homeostázy [37, 38].  $TR\alpha$  má významnou roli primárně během prenatálního vývoje a u dospělých se zapojuje pouze v malé míře, naopak exprimace  $TR\beta$  je zvýšena v pozdním vývoji [32]. Několik studií zmiňuje vliv BPA na embrya obratlovců [39-41], je tedy otázkou, zda zasahuje i do lidského perinatálního vývoje. Studie provedená na pulcích drápatky *Xenopus laevis* zaznamenala inhibici až třetiny T3-dependentních genů doprovázenou kompletní intestinální remodelací již po čtyřdenní expozici. Koncentrace použitá ve studii (0,1  $\mu$ M) se přitom podobá průměrně koncentraci, které jsou běžně vystaveni kojenci [40]. Další studie prokazující působení BPA na embryonální stádium při nízkých koncentracích naopak popsala zesílení T3 a T4 signalizace v larválním stádiu *Danio rerio*, což mělo za následek oddálení doby líhnutí [41]. Disrupce thyroidního systému působením xenoestrogenů

může vést k celé řadě metabolických syndromů, neurobehaviorálních poruch, změnám v imunitním a reprodukčním systému, kardiovaskulárním potížím a některé studie zmiňují i podporu pro vznik obezity a problémy s učením a pamětí [35].

### 3.3 Androgenní receptor

Androgeny jsou skupinou steroidních hormonů potřebných zejména pro správný vývoj a funkci prostaty. Ovlivňují také vývoj, mentalitu a celkovou morfologii v nejranějších stádiích života u mužského pohlaví [42, 43]. Androgeny rovněž nastartují maskulinizaci plodu a aktivují mužský genomový imprinting mozku u vyvíjejícího se plodu [44], mají proto naprosto nezbytnou roli v mužské reprodukci a sexuálním vývoji.

ARs jsou exprimovány v prostatě, svalech, kůži i kostní dřeni [45], ale nejhojněji v Sertoliho buňkách, kde mají významnou roli v udržování spermatogeneze. Dalo by se tedy říct, že Sertoliho buňky jsou primárním zdrojem testosteronové transdukce ovlivňující vývoj a funkci germinální linie. Jakmile se na AR naváže testosteronová molekula, AR podstoupí dimerizaci a translokuje se do jádra, kde se váže na testosteronové promotory [46, 47]. Několik studií udává, že se BPA chová vůči AR jako antagonist [48-50], což se projevuje částečným bráněním v navázání DHT na AR [49]. Antiandrogenní charakter BPA je nejspíše vyvolán inhibicí transkripční aktivity DHT-AR signalizace s následnou inhibicí translokace AR dimeru do jádra [43, 48, 49] (Obr. 4). Zmíněná dimerizace AR po stimulaci testosteron-DHT signálem stabilizuje receptor proti degradaci, přičemž BPA pravděpodobně potlačuje i tuto stabilizaci [43]. Existují další studie, které potvrzují kompetici BPA s DHT o navázání se do LBD receptoru, načež BPA stimuluje downregulaci AR signalizace [48, 51]. Lee, H. J. a spol. však uvádějí schopnost BPA vázat se na mARs, které byly transfekované do HeLa buněk, i v absenci androgenu. Z toho lze usoudit, že BPA je patrně schopený inhibovat stimulaci testosteronové transdukce i nekompetitivním způsobem [49].



Obr. 4 Mechanismus antiandrogenního efektu BPA – inhibice DHT-AR stabilizace [51].

### 3.4 Progesteronový receptor

Progesteron jakožto hlavní regulátor samičích reprodukčních cyklů je hlavním faktorem pro úspěšné proběhnutí těhotenství. Regulace jsou zprostředkované skrze PR řídící především vývojové procesy, proliferaci a diferenciaci. PR je součástí stejné rodiny nukleárních receptorů, kam patří například i ER nebo AR. Mechanismus signalizace s přirozeným ligandem progesteronem proto spočívá ve stejné posloupnosti, kdy nejprve dochází k dimerizaci, poté se dimer váže na PRE a stává se aktivním transkripčním faktorem [52]. Dalo by se proto očekávat, že stimulace receptoru navázáním BPA bude fungovat na stejném principu. Disrupce signalizace progesteronového systému však není v tomto ohledu dosud dopodrobna popsána a do budoucna je zapotřebí provést více studií zaměřujících se na molekulární podstatu aktivace tohoto receptoru.

Jednou z pozorovaných strategií účinku BPA na expresi PR je aktivace skrze kostimulaci ER $\alpha$ , nikoliv však ER $\beta$  [53, 54]. *In utero* studie prokázala zvýšení exprese PR a zesílenou citlivost k progesteronu po perinatální expozici BPA [55]. Zatímco podání samotného BPA vede oproti kontrole k silnější stimulaci PR, v kombinaci s E2 projevuje opačný efekt i přes silnější účinek E2 v porovnání s BPA [53, 56]. Koadministrace BPA spolu s E2 způsobila u primátů *Chlorocebus aethiops sabaeus* výrazné snížení exprese PR v endometriálním stromatu a děložní žláze než tomu bylo u podání samotného E2. Stromatální downregulace klesla o 38 % a glandulární až o celých 50 % [54]. Rovněž bylo popsáno narušení systému PR dospělých jedinců i potomstva březích samic vystavených BPA během těhotenství či během laktace [55, 57, 58]. Změny po expozici představují histologické modifikace v morfogenezi dělohy, prsní žlázy, mozku, rozrušení estrálního cyklu, redukuje schopnost uhnízdění blastocysty během početí a u potomstva způsobuje alteraci v počtu buněk prsní tkáně, který může přivodit až karcinomní stavy [53-55, 59].

### 3.5 Pregnan X receptor

PXR je významným indikátorem přítomnosti toxických látek v organismu a zprostředkovává upregulaci exprese proteinů zapojených do detoxifikačních procesů. Jedná se také o klíčový transkripční regulátor genu CYP3A4 kódující cytochrom P450. Lidský CYP3A4 je primárně exprimován v játrech, kde se podílí na oxidačních a redukčních procesech xenobiotického metabolismu [60, 61]. Nebyly zaznamenány změny v signalizaci mPXR či rRXR, zdá se tedy, že BPA působí jako agonista výhradně na hPXR. K indukci receptoru sice dochází až při vyšší koncentraci 2  $\mu$ M, přičemž navozená aktivita je zvýšena pouze čtyřnásobně, ale v kombinaci s dalšími jeho analogy jako je HPP dokáže indukovat až 30 násobnou expresi CYP3A4 [62]. Některé studie naznačují po expozici BPA změnu v monooxygenázové aktivitě závislé na cytochromu P450, redukcii v hmotnosti jater a brzliku či sníženou katalytickou aktivitu testosteron 6-beta-hydroxylázy [63, 64]. Rovněž bylo zjištěno, že BPA může narušovat metabolismus PXR během těhotenství. Při permanentní perinatální expozici je zřejmě schopný aktivovat fetální hPXR a následně zvýšit riziko aterosklerozy a modulovat epigenezi [65].

Všechny tyto studie však pracují s vysokými koncentracemi v řádech  $\mu\text{M}$  až  $\text{mg}$ , proto se nejedná o příliš spolehlivá data. Vzhledem k selektivitě BPA vůči hPXR je potřeba nejprve humanizovat mPXR pro vytvoření vhodného modelu, což může být důvodem malého počtu studií.

### 3.6 Glukokortikoidní receptor

Pozorování vazby BPA na GR *in silico* umožnilo lokalizovat interakci mezi molekulami. Stejně jako kortisol, přirozený ligand glukokortikoidního receptoru, BPA způsobil změnu v helixu 11 a 12 na stejných aminokyselinových pozicích, přičemž vazba následně aktivovala receptorovou signalizaci [66]. Naproti tomu studie provedená na kvasinkách prokázala absenci agonistické aktivity a byla pozorována zejména inhibice GR [67]. A. Poimenova a spol. se snažili pro změnu popsat funkci GR během perinatální expozice. Potkaní samice byly během období březosti a laktace vystaveny hladině BPA odpovídající  $40 \mu\text{g/kg bw}$  denně a následně byla u jejich potomků stanovena míra hipokampální exprese GRs. Zde se projevila pohlavní diferenciací během BPA-GR interakce, která byla pozorována jako nižší hladina GRs u samičího pohlaví vzhledem ke stejným hladinám kontrol u obou pohlaví [68]. Z dosavadních poznatků o vzájemném působení BPA a GR signalizace nelze s jistotou určit charakter BPA. Existují domněnky, že by BPA mohl hrát roli v glukokortikoidním systému při stimulaci adipogenze [69], u pulce drápatky (*Xenopus*) dokonce způsobil narušení vývoje ocasu [70], což vyzdvihá otázku, zda by BPA mohl působit i morfologické změny. Vzhledem k funkci glukokortikoidů, jakožto hlavní součásti energetické bilance sacharidů, lipidů i proteinů, by stálo za to upřít pozornost výzkumu i v tomto směru.

### 3.7 PPAR $\gamma$ receptor

V moderní společnosti lze pozorovat nárůst dětské obezity, jejíž mechanismus zahrnuje desítky faktorů. Jedním z regulátorů ovlivňujícím množství tukové tkáně je lipogenní gen PPAR $\gamma$ , který má roli v pozitivní stimulaci lipidové akumulace [71]. Vzhledem k všudypřítomné expozici BPA se začala studovat i interakce s tímto receptorem, přičemž bylo zjištěno, že vazebná energie je pro PPAR vyšší než u ER $\alpha$  a ER $\gamma$  [2]. Ukázalo se, že BPA je schopen indukovat adipogenezi prostřednictvím nadexprese celé řady lipogenních genů jako LPL, FAS či SCD-1, včetně PPAR $\gamma$ . Stojí za zmínku, že tyto změny byly pozorovány po nepřímé perinatální expozici u mláďat potkana Sprague-Dawley. E. Somm a spol. vystavili březí samice koncentracím  $1 \text{ mg/L}$  BPA od 6. gestačního dne až po ukončení laktace a následně byli poměřováni samičí a samčí potomci. Zatímco po perinatální expozici byl pozorován nárůst v bílé tukové tkáni u obou pohlaví, po ukončení laktace vznikl mezi pohlavími značný rozdíl, který se u samic projevilo jako hypertrofie adipocytů [72]. Podobné pozorování bylo popsáno i *in vitro* na 3T3-L1 preadipocytech, u kterých bylo pozorováno urychlení diferenciací [73]. Studie zaměřující se pro změnu přímo na molekulární mechanismus, který by mohl stát za narušením diferenciací adipocytů, shrnula své pozorování jako narušení methylace promotoru PPAR $\gamma$  [74].



## 4 Negenomické mechanismy

### 4.1 Membránový estrogenový receptor GPER

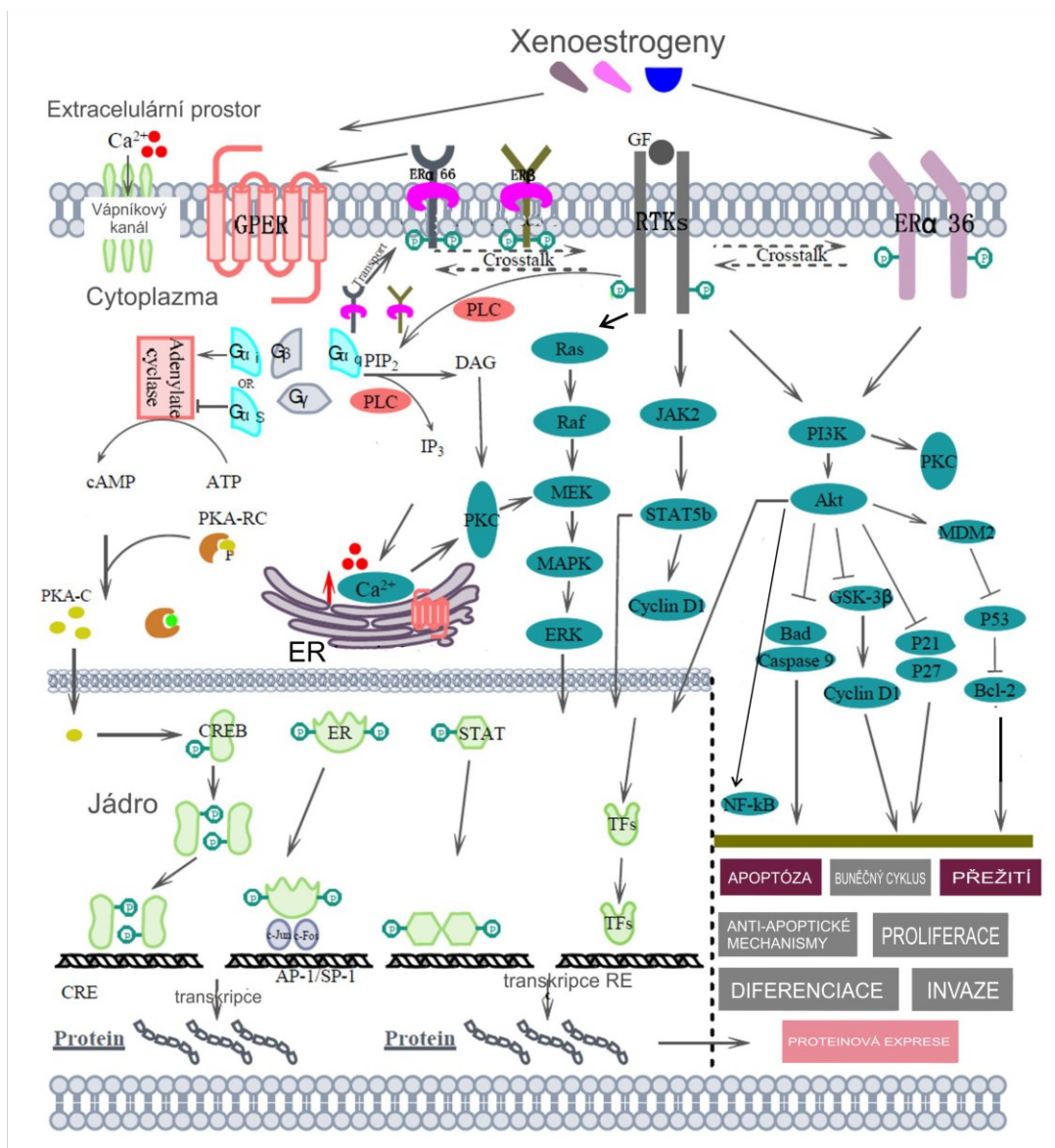
Nukleární ERs a ERRs byly dlouhou dobu považovány za jediný přenos estrogenové signalizace až do konce 21. století, kdy byly pozorovány účinky estrogenu příliš rychlé na to, aby byly zprostředkovány přes jednoduché transkripční regulátory. Rychlá odpověď estrogení signalizace napříč tkáněmi poukázala na možnost negenomické transdukce, která vedla vědce k hledání jiných signálních drah. V roce 2005 byla poprvé charakterizována funkce transmembránového GPR30 jakožto zprostředkovatele estrogenové signalizace, později označeného jako GPER (G protein-coupled estrogen receptor) [75, 76]. Jedná se o klasický GPCR, který prochází 7x membránou a aktivuje postreceptorovou signalizaci vedoucí k amplifikaci signálu. Rozdíl mezi klasickým GPCR a GPR30 je patrný především v subcelulární distribuci. Zatímco GPCRs jsou primárně lokalizovány na plazmatické membráně, v případě GPERs byla jejich exprese pozorována hojně v intracelulárním prostoru, a to konkrétně v tubuloretikulární síti [77]. Početné zastoupení GPER v endokrinním systému vystavuje organismus vysokému riziku poškození zapříčiněným vystavením EDCs [78]. BPA jako jeden z několika environmentálních estrogenů vykazuje schopnost indukce GPER a aktivace signální transdukce s téměř 3% relativní vazebnou afinitou ve srovnání s estradiolem [79].

Xenoestrogenová interakce s GPER spouští řadu buněčných signalizací, které by se daly rozřadit do 4 obecnějších drah: aktivace second messengers, kostimulace transkripčních faktorů, crosstalk s nERs a aktivace JAK/STAT signalizace skrze EGFR [80] (Obr. 5). Genomické procesy diskutovány dříve v této práci jsou doprovázeny značnou prodlevou pro získání buněčné odpovědi. Vzhledem k transkripčním efektům a počtu přechodných kroků zahrnutých v regulaci exprese nabývají zpoždění v řádech hodin až dnů [80]. Naproti tomu odezva účinků zprostředkovaných skrze negenomickou GPER signalizaci vyžaduje pouze několik minut. To dokazuje studie měřící rychlost účinku BPA na napětově řízené  $\text{Ca}^{2+}$  kanály v dorzálních kořenech neuronů. Ukázalo se, že po 5 minutách expozice BPA došlo k inhibici VGCCs, pravděpodobně v rámci zapojení BPA do PKA a PKC signálního systému [81]. Redukovaná exprese PKC byla též asociována spolu s redukcí p-ERK a transkripčního faktoru p-CREB [82], přičemž jedním z genů, které jsou regulovány tímto transkripčním faktorem je protoonkogenní c-Fos. Analýza tohoto genu v GC-2 linii zachytila po vystavení BPA značnou upregulaci. Dalším zkoumaným prvkem v této studii byl protein cyklin D1 regulující buněčný cyklus. Po aplikaci ICI na ER vznikl předpoklad, že inhibiční efekt BPA na tento protein byl zprostředkován právě skrze GPER a EGFR/MAPK signalizaci vedoucí k defosforylaci Erk [83].

Stimulací GPER/EGFR/MAPK pomocí BPA a následnou fosforylací Erk v buňkách A549 byla navozena upregulace MMP, která zapříčinila buněčnou migraci, což lze uvést jako jeden z příkladů karcinogenních účinků BPA [84]. Právě kostimulace GPER a EGFR se přitom zdá být nezbytná pro aktivaci Erk v přítomnosti BPA. Signalizace EGFR/MAPK navozená BPA způsobila indukci

proliferace Sertoliho buněk a navýšení počtu buněk v S fázi již při velmi malých koncentracích v rozsahu 1-10 nM. Tato studie provedená na buněčné linii TM4 se zaměřila na kooperaci GPER s nukleárními receptory a snažila se zjistit, zda je k indukci růstu TM4 vyžadována aktivace ER $\alpha$ /ER $\beta$ . Li-Chen Ge a spol. použili antagonisty ER a GPER pro stanovení intenzity působení BPA. Po administraci inhibitorů ICI a G15 došlo kompletně k zeslabení účinků BPA včetně snížení aktivity Erk. Výsledky studie prezentovaly závislost fosforylace Erk na součinnosti ERs a membránového GPER. Zároveň kombinace BPA, ICI a G15 způsobila pokles exprese Erk znázorňující, že mezi GPER a ER existuje aditivní či synergický vztah [85]. Studie zabývající se proliferací VSMCs naopak poukazuje na možnost nestálé kooperace mezi těmito receptory. Zatímco G15 oslabilo vliv BPA vůči Erk, u ICI nebyla zaznamenána žádná změna [86]. V tomto ohledu je proto zapotřebí provést více studií zaměřujících se na provázání genomických a negenomických mechanismů.

Proliferace a regulace buněčných dějů zahrnuje množství procesů, které mohou být narušeny vlivem xenoestrogenních látek vyúsťujících v hromadnou apoptózu. V tomto ohledu byl studován dopad působení BPA na PTEN/Akt dráhu v Sertoliho buňkách s následným přihlédnutím k hladině prokaspázy-3. Po 24 hodinové expozici  $\mu$ M koncentrace BPA byla naměřena snížená hodnota proenzymu alterující aktivitu kaspázy 3 a zároveň BPA inaktivovalo Akt a zvýšilo expresi PTEN. Je proto pravděpodobné, že změna v aktivitách těchto faktorů zapříčinila náhlé dysregulace v buněčném růstu a PI3K/Akt transdukce může mít rozhodující roli v apoptóze indukované vystavením BPA [87]. Mimo to byla po expozici BPA zdokumentována také downregulace dalších buněčných regulátorů jako jsou p21 a p53 [85]. Z výše uvedeného je více než zřejmé, že pro komplexní porozumění molekulárních interakcí BPA v rámci GPER dynamiky je nejprve nutné objasnit funkci jednotlivých transduktorů v klasické hormonální signalizaci. Následně spolu s pochopením provázanosti signálních drah nukleárních a membránových receptorů lze diskutovat dosah toxicity BPA na endokrinní systém.



Obr. 5 Schématické zobrazení xenoestrogenové signální transdukce prostřednictvím GPER a ERα se znázorněnou komunikací mezi systémy GPER, RTK a ERα. Převzato a upraveno podle [80].

## 4.2 Epigeneze

Epigenetický přenos dědičné informace poprvé představil Conrad Waddington, který jej v roce 1957 popsal jako dynamický proces buněčného rozhodování během vývoje. Buňka se, podle Waddingtona, nachází v určitém bodě, osud buňky přitom není přesně definovaný a její konečný stav závisí na daném prostředí a směru zvolené trajektorie. Koncept stojící na pomezí genotypu a fenotypu se odráží v náhlých modifikacích DNA ovlivňujících strukturu chromatinu a přenášející se do fenotypu jedince [88]. Nejlépe popsaným epigenetickým mechanismem je methylace CpG ostrůvků přesahující do oblasti promotoru u 50-60 % lidských genů, jejichž methylací dochází k umlčování odpovídajících genů [89]. Přestože mechanismy epigeneze zůstávají nevyjasněné a přenos informace se zdá být stabilní, existují studie naznačující vliv environmentálních faktorů na změny na úrovni DNA, včetně BPA.

Vlivem navozené hypermethylace došlo k inhibici proliferace spermatocytů, k redukci kapacity buněk GC-2 a úroveň apoptózy GC-2 dosáhla až na 19 % při koncentraci 80  $\mu\text{M}$  po dobu 48 h [90]. V lidských neuroblastomech bylo změřeno výrazné navýšení globální methylace i při mnohem nižší koncentraci 10  $\mu\text{M}$  po dobu 96 h. Kromě změn v expresi byly pozorovány i histonové modifikace [91]. Naproti tomu studie provedená na vzorcích lidské jaterní tkáně v gestačním období vykazuje opačné výsledky. U těchto vzorků byly změřeny hladiny BPA, které se pohybovaly v rámci ng/g a následně byly tyto vzorky podrobeny sekvenování pro zmapování methylovaných oblastí. CpG ostrůvky podléhaly hypermethyloci, kdežto u CGI shores a CGI shelves byla detekována zřetelná hypomethylace, zprůměrované hodnoty proto vyjadřovaly globální hypomethyloci [92]. Podle studie z roku 2014 estradiol dokáže způsobit pokles hladiny methylace v rakovinotvorných buňkách prostaty prostřednictvím ER $\beta$  [93]. Demethylace DNA demonstrována na E2 poukazuje na možnou roli ERs v tomto procesu, je tedy možné, že BPA se svými estrogenními vlastnostmi bude ovlivňovat výslednou podobu DNA právě přes tyto receptory. Vliv BPA při epigenetických procesech tedy může mít jednu z hlavních rolí v pozměnění genové exprese predisponující organismus k celé škále poruch a onemocnění.

### 4.3 Oxidativní stres

Nerovnováha mezi produkcí reaktivních metabolitů a defensivním mechanismem v podobě antioxidantů zhoršuje schopnost organismu chránit buněčnou vitalitu. Vzniklý oxidativní stres navozuje poruchy na molekulární až tkáňové úrovni a způsobuje rozsáhlé patogeneze zahrnující řadu nemocí – např. Parkinsonovu nemoc a Alzheimerovu chorobu, ale také karcinogenezi, kardiovaskulární obtíže či poruchy vývoje [94, 95]. Je zdokumentováno, že malé dávky BPA při dlouhodobém působení mohou ovlivňovat reprodukční systém, vývoj a způsobovat rozsáhlé onemocnění [96]. ROS jsou generovány díky vlastnosti kyslíku snadno akceptovat elektrony a vytvářet tak velmi reaktivní radikály. Kobayashi K. a spol. zkoumali úroveň ROS a oxidativního stresu indukovaného BPA v plazmě a hipokampu potkanů, přičemž scavenging kapacita (=schopnost zachytávat volné radikály) O $_2^{\bullet-}$  a OH $^{\bullet-}$  v plazmě byla po dvou týdnech expozice při vysokých koncentracích silně zredukována. To naznačuje schopnost BPA snížit antioxidační kapacitu. V hipokampu se pro změnu zvýšil poměr oxidovaného DJ-1 a DJ-1, který hraje podstatnou roli v ochraně proti oxidativnímu stresu. Mimo to byla navozena i upregulace SOD1, zato hladina SOD2 zůstala oproti kontrole nepozměněná. Oxidativní stres způsobený BPA proto zřejmě nenarušil mitochondriální elektronový řetězec [97]. Narušení antioxidačního defensivního systému i během perinatálního vývoje dokládá studie měřící alteraci v relativní expresi genů Sod1, Sod2, Cat a Gpx2 s následnou zvýšenou lipidovou peroxidací [98]. Studie zaměřená na působení BPA na mozek kuřecích embryí zdokumentovala léze, demyelinizaci a malformaci. Výsledky této studie rovněž ukázaly zvýšenou hladinu MDA a sníženou hladinu GSH, avšak rozdíl v hodnotě absolutní antioxidační kapacity mezi kontrolou a testovanou skupinou zaznamenán nebyl [99]. Oxidativní poškození způsobené BPA bylo pozorováno nejen v mozku, ale i v ledvinách, játrech a varlatech již po 5 dnech

administrace, přičemž změny v hodnotách enzymů chránících buňku před oxidativním stresem se v tkáních vzájemně lišily. Tato studie zároveň naznačuje, že cytotoxicita způsobená BPA je pravděpodobně indukována nadprodukcí  $H_2O_2$  [100].

Antioxidanty jakožto inhibitory oxidace v organismu chrání před účinky volných radikálů a spekuluje se proto i o tzv. antioxidační terapii. Při podání je však nutné zhodnotit vhodnou dobu působení, dávku, typ antioxidantu nebo i jejich kombinaci [III]. Touto možností jak zeslabit účinek ROS se zabývají i výzkumy zaměřené na chování EDCs. Jeden z těchto výzkumů se věnoval vlivu  $\alpha$ -tokoferolu (ATF) a  $\alpha$ -lipoové kyseliny (ALA) při vzájemném působení BPA. Oba antioxidanty se ukázaly jako účinné v zamezení peroxidace lipidů v játrech a ovariích. Expozice BPA způsobila nárůst hladiny GPx v reakci na hromadící se ROS. Po administraci vždy jednoho z antioxidantů v přítomnosti BPA bylo možné pozorovat redukci v hladině MDA spolu s NO, současně však u hladiny GPx byl měřen neočekávaný pokles. ALA i ATF jsou jedny z neefektivnějších látek chránících organismus před poškozením DNA [101, 102], v této studii se však ATF podílel efektivněji na zmírnění následků oxidativního poškození [103]. Další z možných látek podílejících se na snížení celkové oxidační kapacity je metformin. Podle nové čínské studie z tohoto roku působí metformin jako antioxidant při tkáňových poškozeních navozených BPA. Ve skupině potkaních samců, kterým bylo podáno sérum BPA spolu s metforminem, došlo ke snížení hladiny MDA a vylepšení celkové oxidační rovnováhy a navýšení GPx [104]. V případě metforminu se trend antioxidační aktivity vyvinul podle očekávání. Naproti tomu dávka ATF/ALA spolu s BPA způsobila výraznou redukci v expresi GPx. Z toho lze usuzovat, že GPx zřejmě reaguje na rychle zvýšenou toxicitu způsobenou BPA a dochází tak k ihned zvýšené aktivitě enzymu. Jakmile pak antioxidanty přidané do séra inhibují peroxidaci, převzou pravděpodobně částečnou funkci GPx a hladina GPx klesne [103]. Přesné mechanismy oxidativního stresu v souvislosti s působením BPA však zůstávají stále otázkou.

## 5 Toxické působení BPA

### 5.1 Játra

Jedním z nejčastějších histopatologických poškození jater jsou následky způsobené právě nadměrným oxidačním stresem vyvolaným delším působením BPA. Tyto projevy se podílí na celkovém snížení hladiny antioxidantů, jako jsou GGT či GPx spolu s nárůstem produktů ROS reakcí, zejména MDA. Mimo to dochází ke zvýšení hladin jaterních enzymů, především ALT a AST udržující rovnováhu v cyklech jaterních metabolitů. Rovněž způsobuje výrazné snížení exprese CBS a CSE, enzymů metabolických drah methioninu a cysteinu, do kterých spadá i regulace hladiny GSH. Zmíněné změny byly v této studii pozorovány jako smrt'ování jader hepatocytů s následnou nekrózou doprovázenou nahromaděním protizánětlivých buněk [104]. Podobný trend byl sledován i v další studii. Hladina ALT i AST se ve skupině, které bylo podáváno 50 mg BPA bw po dobu 8 týdnů, zvýšila až trojnásobně oproti

kontrolní skupině. Kromě výše zmíněných projevů oxidačního stresu byla zaznamenána čtyřnásobně snížená hladina CAT, trojnásobný nárůst v počtu prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a až sedminásobný pokles protizánětlivého IL-10. Dlouhodobé podávání malých dávek BPA vyvolalo výrazné změny v jaterní tkáni v podobě zvyšující se hustoty kolagenního vaziva kolem portální žíly, které došlo až do stavu jaterní fibrózy [105].

Aktivita CAT hraje zřejmě jednu z hlavních rolí při regulaci celkové rovnováhy během vzniku oxidačního stresu v hepatocytech. Bylo zjištěno, že k aktivaci CAT dochází *in vitro* už při nízké koncentraci BPA, přičemž při zvyšující se koncentraci BPA se zvyšuje i aktivita CAT. Oproti tomu studie *in vivo* prokázala redukci aktivity CAT až o 30 % s vysokými dávkami BPA (80 mg/kg) v porovnání s kontrolou. Z toho lze vyvodit, že rostoucí trend hladiny CAT spolu s BPA je limitován horní hranicí a při vyšších dávkách pozorujeme inhibiční aktivitu BPA. Společně s narušením aktivity CAT způsobuje BPA i změnu sekundární struktury enzymu. Tu představuje po navázání BPA do kapsy CAT vyšší zastoupení  $\alpha$ -helixů než  $\beta$ -listů. Předpokládá se, že vazbou BPA pomocí elektrostatických a hydrofobických interakcí může dojít k narušení fyziologické funkce CAT [106].

Všechny výše zmíněné faktory mohou být i příčinou narušení funkce elektronového transportního řetězce. Vzhledem k vysoké denzitě mitochondrií v jaterní tkáni, výrazné narušení správného chodu této malé elektrárny může být devastující. Byly pozorovány edémy, hepatocelulární degenerace, hemoragie, při nejvyšších dávkách dilatace a kongesce centrální a vrátnicové žíly a rozsáhlá proliferace Kupfferových buněk. Degradace aktivity byla naměřena u všech komplexů I-V. Narušení funkce jednotlivých komplexových enzymů může vést k vadné distribuci elektronů na obou stranách membrány a dojít tak k uvolnění superoxidů a k ještě vyššímu nárůstu ROS v tkáni. Zhoršení celkového energetického metabolismu může následně opět přispět ke zmíněné hepatotoxicitě [107].

## 5.2 Mozek

Problém celkového porozumění dopadu působení BPA na mozek v souladu s jeho rozsáhlými mechanismy se vztahuje ke komplexitě fyziologie CNS. BPA dokáže projít hematoencefalickou bariérou [108] a vázat se zde na neurální receptory. Svojí přítomností ovlivňuje hladiny neurotransmiterů a pohlavních hormonů. Rozrušení neurologických mediátorů má za následek zejména poškození paměti, obezitu či hyperaktivitu, hormonální disbalance pak vede ke komplexním změnám v sexuální, maternální a sociální chování [109, 110].

Mimo zmíněné změny byly po expozici BPA pozorovány i změny v chování projevující se jako úzkost či deprese. Tyto projevy byly však popisovány hlavně na dospělých myších samcích. Známky behaviorálního narušení jsou v této studii, mimo jiné, přisuzovány redukci hladiny testosteronu jak v séru, tak v mozku [111]. Významným faktorem v regulaci emocionální rovnováhy je rovněž inhibiční neurotransmitter GABA. GABAergní systém, lokalizovaný především v hipokampu a v hypothalamu,

zároveň podporuje i potlačuje vznik úzkosti a deprese [112]. U těchto myších samců byla rovněž pozorována snížená hipokampální hladina GABA receptorů korelující s pasivním chováním, např. imobilizací [111]. Podle klinických i laboratorních studií inklinuje inhibice tohoto mediátoru právě k úzkostným stavům [112]. Kromě GABA systému, působí BPA toxicky i na systémy Glu, Ach a 5-HT a vyvolává značnou disrupci v homeostázi neurotransmiterů v závislosti na pohlaví a dávkách. Rozdíly byly měřeny po postnatální expozici a u samic byly tyto odchylky pozorovatelné hlavně při středních (50 µg/kg/den) a vysokých dávkách (5 000 µg/kg/den), kdežto u samců se výraznější změny projevily při malých (0,5 µg/kg/den) a vysokých dávkách. Zejména poměr Glu/GABA se u obou pohlaví, ovšem při různých dávkách, zvýšil až dvojnásobně [113]. Vezme-li se v potaz klíčová role všech těchto chemických látek při učení a ovládání paměti [114], lze předpokládat, že BPA má vliv i na tyto schopnosti. Výsledky experimentu zaměřeného na prostorovou paměť a učení po vystavení BPA ukazují v obou případech značné oslabení [113].

Právě zvýšená nerovnováha Glu/GABA homeostáze indukovaná dlouhodobou expozicí BPA funguje jako spouštěč pro narušení synaptické plasticity [113]. Mechanismy toxicity BPA zde spočívají v dysregulaci signální kaskády zprostředkované vazbou BPA na NMDA receptory a následnou excitací či inhibicí LTP. Aktivita NMDA se při nízkých koncentracích (100 nM) zvyšuje a vzrůstá i přítok  $\text{Ca}^{2+}$  [115] způsobující depolarizaci membrány a excitaci LTP, naopak při vysokých dávkách (1000 nM) dochází k redukci membránových NMDA receptorů a následné inhibici potenciace. BPA má v tomto případě značný duální účinek [115, 116]. Současně bylo zjištěno, že zvýšená intracelulární hladina  $\text{Ca}^{2+}$  je indukována aktivací Erk signální kaskády vazbou BPA na GPER a posílení LTP proto závisí i na kompetici BPA s estradiolem [116]. Disrupce v poměru neurotransmiterů a NMDA a AMPA receptorů a s tím související narušený práh EPSP a intenzita LTP má za následek zhoršení synaptické plasticity. Tu lze pozorovat změnou v morfologii neurálních buněk, a to například jako sníženou hustotu dendritických výběžků pyramidálních neuronů v CA1 oblasti hipokampu [108], redukci v celkové síti dendritů a jejich propojení a zkrácení délky výběžků [113].

## **5.3 Reprodukční systém**

### **5.3.1 Samčí reprodukční systém**

Otázka vztahující se k toxicitě BPA se věnuje především rozporu ve velikosti aplikovaných dávek na samčí pohlavní orgány. Vysoké dávky mohou redukovat velikost i objem varlat a prostaty a narušit produkci spermií [117-119]. Vzhledem ke stopovým koncentracím vyskytujícími se přirozeně v environmentálním prostředí se vědci snaží zaměřit na nM koncentrace. Expozice 1-10 nM BPA měla za následek například výraznou aktivaci buněčné migrace a modulaci  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace v lidských adenokarcinomech prostaty [120]. Jak už bylo zmíněno, všudypřítomný BPA se do těla dostává nejčastěji příjmem potravin a tekutin, přičemž výsledky světových studií zobrazují akumulaci BPA již ve fetálním období, ale i u dětí, během dospívání a u dospělých [7, 121, 122].

*In vitro* studie provedená na vzorku 190 mužů ve věku 18 až 55 let analyzovala jejich vzorky moči a spermatu. Přítomnost BPA ve vzorcích moči byla detekována v 89 %, přičemž výsledky ukazovaly pozitivní korelaci mezi koncentrací BPA a jednořetězcovými zlomy v bičíku spermií [123]. Výsledky poukazující na vztah mezi expozicí BPA a kvalitou spermatu se ztotožňují s dalšími studiemi provedené na zvířecích modelech [124, 125]. Poškození DNA bylo zároveň doprovázeno poklesem v počtu spermií, sníženou pohyblivostí a změnou v morfologii [123]. *In vivo* studie stanovila vztah mezi dávkami BPA a hladinou ROS v reprodukčním systému potkanů. Vyšší koncentrace BPA způsobily navýšení oxidativního stresu, který indukoval aktivitu lipidové peroxidace. Rovněž se ukázalo, že BPA značně snižuje hladinu testosteronu, který má klíčovou roli při spermatogenezi. Dysbalance v hladině ROS spolu s inhibicí testosteronového signálu vyúsťuje v alteraci spermatogeneze a působí změny na úrovni histologických struktur [126]. Snížená hladina testosteronu je důsledkem downregulace AR exprese, ale také genů spřažených s mechanismem spermatogeneze, jejichž exprese byla rovněž ovlivněna vystavením BPA [47]. Spolu s testosteronem působí na samčí pohlavní systém i gonadotropní hormony LH a FSH. Po 6 týdnech podávání vysokých dávek BPA bylo v plazmě pozorováno snížení hladin obou hormonů, což mělo za následek podstatnou redukci v počtu Leydigových buněk [127]. Nicméně působení BPA na Leydigovy buňky se v několika studiích navzájem liší. Schopnost BPA potlačit v hypofýze sekreci LH [127] by měla vést k disrupci hormonální funkce Leydigových buněk a utlumení jejich funkce. L. Chen a spol. však nezaznamenali změny v hladině LH, ani FSH a naopak sledovali zvýšenou hladinu testosteronu. BPA sice neindukovalo proliferaci, ale byly pozorovány stimulační účinky v diferenciaci Leydigových kmenových buněk a jejich prekursorů. BPA a jeho vliv na hormonální systém proto může hrát roli v sexuální vyspělosti během období dospívání [128]. Mimo Leydigovy buňky se studie hlavně zaměřují také na působení BPA na Sertoliho buňky. V rámci Sertoliho buněk je popisován podobný trend, kdy BPA alteruje s buněčnou životaschopností i proliferací. Vztah mezi koncentrací BPA a buněčnou vitalitou a proliferací byl studován na linii TM4. Zatímco nanomolové dávky stimulovaly proliferaci TM4, u mikromolových dávek byla pozorována inhibice. Nižší koncentrace měly oproti kontrole za následek větší počet buněk v S fázi a zároveň množství anti-apoptických faktorů Bcl-2 a cyklinu D1 bylo vyšší ve srovnání s mikromolovými dávkami [129]. Vzhledem ke změnám v expresi buněčných regulátorů není překvapivé, že cytotoxický efekt BPA na Sertoliho buňky může způsobit apoptózu. Tyto efekty jsou přitom zjevně podmíněné velikostí dávek BPA [130].

### 5.3.2 Samičí reprodukční systém

Jedním z mechanismů účinku BPA na samičí reprodukční systém je disrupce hormonální rovnováhy prostřednictvím HPG osy. Po perinatální expozici byla u myši v F1 generaci pozorována zvýšená hypotalamická transkripce KISS1 genu a od ní se odvíjející změny v hladinách hormonů GnRH a FSH [131]. GnRH je hlavním regulátorem reprodukčního systému. Integruje podněty ze sexuálních steroidů, glukokortikoidů, nutričního a metabolického stavu, hladiny stresu, prolaktinu a dalších peptidů



pro kontrolu správné sekrece gonadotropinů a správné funkce gonád [IV]. Estrogen přirozeně ovlivňuje mRNA expresi v neuronech sekretující GnRH, kde funguje jako transkripční faktor. Proto lze v těchto neuronech nalézt značné množství receptorů ER $\alpha$  a ER $\beta$  [132]. Pro stanovení mechanismu BPA v těchto neuronech byly tyto vstupní signály ER $\alpha$  a ER $\beta$  izolovány. Je známo, že BPA vykazuje primárně estrogenovou aktivitu, i přes to ale byla zjištěna schopnost BPA inhibovat aktivitu GnRH [133]. Jeví se tedy jako disruptor schopný působit na GnRH neurony přímo, bez účasti v některé z ER signalizací [133]. Možným mechanismem v tomto případě by mohla být změna v intracelulárním influxu Ca<sup>2+</sup>. Podle nedávné studie inhibice VGCC vedla ke zrušení aktivity BPA [134]. Předpokládá se proto, že transdukce xenoestrogenového signálu v GnRH neuronech je zprostředkována právě skrze tyto VGCC [134].

Další hormon HPG osy FSH podporuje rozvoj folikulů, reguluje ženský cyklus a spolu s ním i hladinu IGF-1, který má klíčovou roli zejména v růstu, diferenciaci a přežívání granulозních buněk a v regulaci steroidogeneze [135]. Jelikož estrogen indukuje crosstalk mezi ER $\alpha$  a IGF-1 signalizací, rozhodli se Hwang a spol. demonstrovat tuto transdukcí na BPA. Pozorované výsledky nejenže naznačovaly schopnost BPA upregulovat expresi obou faktorů, ale potvrdily i zásah BPA do crosstalku mezi oběma signálními systémy [136]. Jiná studie naopak zaznamenala po expozici dramatické snížení IGF-1 v granulозních buňkách [137], je proto možné, že zde BPA působí duální efekt. Otázku, do jaké míry spolu souvisí BPA a ženský cyklus, se snažila zodpovědět studie sledující hladinu BPA u žen před a po menopauze. Hodnoty oxidativního stresu a prozánětlivých faktorů byly o poznání výraznější u žen po menopauze naznačující vyšší riziko buněčného poškození v tomto období. Vědci v této studii se domnívají, že větší toxicita BPA během postmenopauzy může být důsledkem nižší hladiny estrogenu, což by snižovalo kompetici BPA a estradiolu o ER a pravděpodobnost navázání BPA s následnou stimulací estrogení transdukce by se tak zvýšila [138]. Existují i studie věnující se dopadu BPA na IVF poukazující na možné narušení nidace, ale některé toto vyvracejí [139-141].

Účinky BPA na samičí reprodukční systém jsou mnohem rozsáhlejší. Ukázalo se, že BPA narušuje tvorbu MTOC a centrozomu během meiozy oocytů a zároveň byla pozorována korelace mezi rostoucí koncentrací BPA a snižujícím se počtem oocytů dozrávajících do metafáze I a později i do metafáze II [142]. Právě deformace mikrotubulárního systému by mohla být důvodem vzniklé aneuploidie detekované po expozici [143], což by mohlo odpovídat i chybějícímu chromozomu v prvním polárním tělísku [142]. Vystavení BPA rovněž způsobilo upregulaci genů mající roli v maturaci oocytů a zvýšení exprimace ERs a ERR $\gamma$  v ovariích [144]. Zejména alterace v genové expresi se zdá být hlavním důvodem inhibice vývoje ovariálních folikulů a žlutého tělíska, které byly popsány ve studii zkoumající až 193 proteinů začleněných do mechanismů maturace [145]. Expozice BPA v potkaních T-1 buňkách také pozitivně stimulovala hladinu progesteronu a potlačila hladinu estrogenu, což by mohlo přispívat k inhibici LH. Disrupce ovariální steroidogeneze by proto mohla být způsobena i změnou v hladinách steroidogenních enzymů [146].

BPA rovněž ovlivňuje vývoj a morfologii prsní žlázy. Studie provedená na modelu *Makak rhesus* pracovala s březími samicemi, kterým byl orálně podáván BPA v gestačním období mezi 100. a 165. dnem při koncentraci 400 µg/kg bw. Narozeným samicím byly poté odebrány prsní žlázy a pozorovány morfologické změny. Testovaná skupina oproti kontrole vykazovala vyvinutější mléčné žlázy s rozsáhlejší sítí mléčných vývodů [147]. Prenatální expozice BPA celkově narušuje tkáňovou architekturu pohlavního systému. U myšího modelu CD-1 i potkana Sprague-Dawley byla pozorována redukce ve vrstvě děložního endometria [148, 149]. Negativní změny byly detekovány i na modelu *Makak rhesus*, u kterého se změnilo celkové procentuální zastoupení buněčných typů ve fetálním vejcovodu. Byl popsán nárůst v distribuci řasinkového epitelu a snížené množství mukosubstance a proteinu uteroglobinu v sekrečních buňkách plodu [150].

Toxické působení BPA na samičí pohlavní systém je obsáhlé a spousta mechanismů je zatím pouze jen pozorována ale nikoliv popsána. Díky agonistickému charakteru BPA vůči estradiolu je složité s přesností rozlišit rozsah působícího mechanismu mezi přirozeným estrogenem a uměle syntetizovaným xenoestrogenem. Chápání toxicity bude proto vždy limitováno tím, do jaké míry bude charakterizován crosstalk mezi signálními dráhami.

## 5.4 Vývoj plodu

Je dokázána prostupnost BPA přes celou řadu membrán, od buněčných přes jaderné až k hematoencefalické bariéře, a proto se do centra pozornosti dostala i možnost BPA prostoupit placentu a působit tak negativně na vývoj plodu. *In vivo* studie provedená na kuřecích embryích prokázala narušení embryonálního vývoje. Po expozici BPA došlo k upregulaci mRNA exprese genů *Stra8* a *Dazl*, dvou z regulátorů oogeneze. Protein kódovaný genem *Stra8* iniciuje tranzici mezi mitózou a meiózou [V] a gen *Dazl* je translatován v protein regulující translaci klíčových transkriptů [VI]. Jejich zvýšená exprese spolu s hypomethylací způsobila zrychlení embryonálního vývoje do stádia meiózy. Vzhledem ke xenoestrogenové aktivitě BPA byla rovněž měřena exprese estrogenových receptorů ERα, ERβ a GPER. Byla pozorována zvýšená kapacita ERβ indikující, že narušení vývoje oocytů probíhá skrze ERβ signální kaskádu [151].

Jiná studie zabývající se účinkem BPA na epigenezi během vývoje potvrdila změny v methylaci DNA lidských potomků. Výsledky získané ze vzorků pupečnickové krve po maternální expozici BPA byly spojeny s hypermethyloací CpG ostrůvků promotorových oblastí genů *CAPS2*, *TNFRSF25* a *HKR1*. Methyloace *CAPS2* se ukázala jako indikátor snižující celkovou hladinu IQ u dětí ve věku 6 let [152]. *TNFRSF25* z rodiny TNF receptorů je regulačním faktorem homeostázy lymfocytů a buněčné apoptózy, proto narušená exprese tohoto genu může vést ke změnám v proliferaci B a T lymfocytů. Také detekovaná změna ve stimulaci NF-κB může navodit celou řadu buněčných dějů a způsobit disrupci celkového imunitního systému [VII]. *HKR1* gen je asociován s fetálním alkoholovým syndromem [VIII], který se u plodu a novorozence projevuje růstovou retardací, kraniofaciální dismorfii a

poškozením CNS [IX]. Jeho knock-out se *in vitro* projevil jako letální, poukazující na vitální roli genu pro přežití [153]. Není proto pochyb, že downregulace těchto genů způsobená hypermethyloací promotorů je asociována s narušením fetálního vývoje. Rovněž BPA bylo detekováno z krve u 70 % testovaných těhotných žen a u 30 % byla naměřena nízká hladina i v pupečnickové krvi [122].

Koncentrace se však naprosto liší ve studii provedené na zvířecích modelech. Myším a japonským opicím (*Macaca fuscata*) byla podána jediná dávka (100 mg/kg u myši, 50 mg/kg u opic) a následně po krátkém časovém intervalu byla shromážděna data (0,5 – 24 h u myši, 1 h u opic). Hladina BPA v pupečnickové krvi a séru plodu se pohybovala v nižších koncentracích, kdežto v orgánech byl pozorován výrazný nárůst. Detekovaná hladina v srdci, střevech, játrech, slezině, ledvinách, brzlíku, svalech, mozku, Varolově mostu, a v mozečku byla průměrně až 7x vyšší, z toho nejméně se navýšila ve slezině (3x) a nejvíce v mozečku (12x) [154]. Tyto výsledky demonstrují, že nízká koncentrace BPA detekována v pupečnickové krvi nemusí ihned odpovídat hladinám v orgánech plodu, které mohou být po akumulaci mnohem vyšší.

## 6 Akumulace BPA v organismu

Několik environmentálních studií poukazuje na problém enormní výroby xenoestrogenů a jejich hromadění v životním prostředí následované toxickými účinky těchto chemikálií. Bisfenoly obecně jsou jedny z nejrozšířenějších takových látek, jejichž každodenní využití má za následek nekontrolovatelnou kumulaci v prostředí, kterým jsme obklopeni. Bisfenoly včetně BPA, který tvoří až 60 % z celkové naměřené koncentrace bisfenolů v prostředí, byly detekovány v sedimentech, ve vodě i v prachu uvnitř budov po různých místech na zemi, například v indických vodách dosahovala koncentrace BPA až 380 ng/L. Oproti tomu studie z Řecka, USA a Japonska naměřily v prachu až 4x vyšší hodnoty. BPA tedy proniká z továren přes spotřebitele až do životního prostředí a stává se součástí fauny i flory, odkud se dostává zpět do lidského organismu. Potraviny a tekutiny uchovávané v plastových obalech či konzervách jsou nejčastějším prostředkem, jak se BPA dostane do těla [155-159].

Americká studie z let 2003-2004 detekovala BPA ve vzorku moči u 93 % z 2 517 probandů. Průměrná koncentrace naměřená u dětí (4,5 µg/L) byla výrazně vyšší než u dospívajících (3 µg/L) a dospělých (2,5 µg/L) [160]. Podobná hladina BPA byla změřena i v německé studii z roku 2009 zaměřené pouze na dětské uchazeče, která detekovala přítomnost BPA u téměř všech vybraných vzorků moči (2,7 µg/L) [161]. Přitom doporučená maximální denní dávka BPA je podle EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) z roku 2015 4 µg/kg bw [X]. Obsah BPA v potravinách se pohybuje v řádech nanogramů, přičemž nižší hodnoty jsou detekovány v mase, rybách, mléčných výrobcích, ovoci a zelenině, ale i například v cukrovinkách. Nejvyšší koncentrace je možné naměřit v konzervách či nápojích v plechovkách [155, 156]. Využití BPA je dalekosáhlé, například ve směsi s diglycidyl methakrylátem ho známe jako těsnicí hmotu používanou v zubařské medicíně. Jakožto adhezivní

materiál zachraňující lidský chrup už je znám několik desítek let, i zde ale bylo pozorováno uvolňování BPA do organismu. Koncentrace BPA zjištěná ze slin uchazečů podstupující zubařské zákroky se pohybovala v rozmezí od 15,3 do 32,4 ng/ml [162]. Vyhnout se expozici BPA je v dnešní době nemožné a lze s jistotou říci, že BPA se do těla absorbuje každý den. Data z NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) odhadují hladinu přijatého BPA na 30 až 70 ng/kg denně [155]. Orální expozice je jedna z nejčastějších, BPA může být ale i vdechnuto či absorbováno přes kůži. Kožní penetrace byla poprvé zaznamenána kolem roku 2010, kdy se začaly objevovat studie na pronikání BPA do organismu z termálního papíru [163]. Nejvíce zasaženými mohou proto být lidé pracující denně s účtenkami. Aby se zjistila míra expozice, byli dobrovolníci v experimentu z roku 2016 požádáni napodobit práci pokladních. Pracovali 8 hodin po dobu 5 dní tak, aby kontakt s termálním papírem odpovídal reálné pracovní pozici, přičemž v té době odpovídala koncentrace 23,5 mg BPA/g termálního papíru. Během i po skončení experimentu byla detekována až 3x vyšší hladina BPA v moči dobrovolníků naznačující schopnost BPA akumulovat se v organismu [164]. Celkově bylo BPA nalezeno v játrech, ledvinách, folikulech, ve spermatu a v krvi a u těhotných žen v plodové vodě, mateřském mléce, neonatální krvi, placentě a pupečnickové krvi [165]. Podle Nunez a spol. se však BPA prvořadě ukládá do hnědé tukové tkáně a může proto ovlivnit energetickou bilanci [166]. Akumulace v tukové tkáni souvisí zřejmě i se schopností BPA indukovat adipozitu a proto hraje roli, mimo jiné, i při změnách v tělesné hmotnosti [167-169].

## 7 Alternativy BPA

S rostoucí spotřebou BPA roste i globální trh, do roku 2023 je předpokládáno zvýšení výroby až na 7 348 tisíc tun [XI]. Nejrozličnějšími BPA výrobky je společnost zcela pohlcena, a proto význam pátrání po bezpečných alternativách je více než žádoucí. Vzhledem ke xenoestrogenové aktivitě BPA byly již učiněny řádné kroky v regulaci koncentrace, která může být v produktech přítomna. Vzhledem k vlivu BPA zejména na postnatální vývoj FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) zařadila BPA mezi toxické látky už v roce 2010. EU na základě ECHA (Evropská agentura pro chemické látky) poté vydala v roce 2011 v platnost zákaz o prodeji kojeneckých lahví obsahujících BPA [XII]. K roku 2020 přibyla vyhláška o omezení koncentrace BPA v termálním papíru [XII]. Studií na BPA raketově přirůstá, rozšiřuje se povědomí o možné toxicitě jak na dospělý organismus, tak na fetální vývoj, a proto se na trhu objevuje čím dál tím větší množství tzv. BPA-free produktů. Za tímto názvem stojí nahrazování BPA jeho analogy, zejména bisfenolem S a bisfenolem F. Objevují se i formy BPAF, BPE, BPB, TBBA, a další. Absence BPA může mít zprvu zavádějící význam, jelikož na spotřebitele působí bezpečně bez starosti o nežádoucí dopady na metabolismus. Tomu ale rozporují studie dokazující podobné nebo horší toxické účinky BPA analogů.

Jak už bylo zmíněno dříve v této práci, rozhodujícím pro navázání BPA je OH skupina fenolového kruhu, proto i tyto alternativy se mohou snadno vázat. Celá řada analogů je schopna se vázat

na nukleární i membránové estrogenní receptory a některé z nich i na ARs [156]. Například u halogenových forem BPA-monoF a BPA-diF byly dokonce prokázány silnější interakce s receptorem  $ERR\gamma$ , lze se tedy domnívat, že toxicitu zvyšují právě skrze nukleární receptory [30]. BPAF se rovněž prokázal stejně toxický jako BPA [170]. Endokrinní disrupce se potvrdila i u dalších analogů. Břeží potkani byly vystaveny expozici BPB, BPF a BPS, což mělo u F1 samčí generace za následek redukcii spermií, snížila se hladina testosteronu a byly pozorovány i histologické změny v gonádách [171]. BPS působí značnou inhibici v genové expresi podobně jako BPA [172]. Projevy působení se projeví jako známky poškození DNA, karcinogenity, oxidačního stresu, rozsáhlých devastujících účinků na metabolismus a objevila se i senzibilizace kůže, podobně jako tomu je u BPA [173].

Komplexních studií o účincích a vlastnostech analogů je však stále nedostatek. Paradoxem proto zůstává, že se BPA nahrazuje bez váhání těmito deriváty, i přesto že některé studie dokazují vyšší toxicitu než u BPA [174]. Existuje velké množství studií týkajících se vlastností BPA, ale malé věnující se jeho alternativám, početnější výzkumy studující význam analogů se rozběhly až po roce 2010 [175]. Podle RAC (ECHA's Committee for Risk Assessment), Belgie podala návrh na vyhotovení klasifikace pro označení BPS jako toxické látky a výsledky RAC by měly být vyhotoveny již v roce 2021 [XII]. Studium disruptčních aktivit BPA se proto dnes může zdát bezúčelné při rostoucích regulacích BPA a pravděpodobným zvyšujícím se trendem nahrazování jinými materiály. Naproti tomu právě díky enormní produkci a spotřebě se BPA stal jedním z nejvíce studovaných environmentálních disruptorů a přinesl tak nové znalosti o molekulárních mechanismech EDCs.

## 8 Závěr

Do dnešní doby byl nashromážděn již velký objem studií zabývajících se endokrinní aktivitou BPA. Některé publikované výzkumy se snažily zohlednit reálnou podstatu vystavení BPA a přizpůsobit tomu i metodiku své práce v rámci použité koncentrace, dávkování, způsobu podání a doby expozice. Mnoho ostatních ale pracovalo buď s malým vzorkem, příliš vysokými koncentracemi nebo podávaly BPA injekčně do krve či cílových tkání. Nesoulad ve způsobu provedení experimentů má za následek různorodé výsledky, což způsobuje, že i vědci se mezi sebou nemohou dohodnout, jak vysoká je míra toxicity. Z dosavadních poznatků lze říci, že BPA vstupuje do buňky přes nukleární receptory a membránové GPER. Molekulární mechanismus interakce s nukleárními receptory tkví v navázání se do vazebné kapsy přes OH skupinu fenolového kruhu s následnou stabilizací H-můstky. Dochází ke změně konformace receptoru a po aktivaci vytváří komplex s responsivní elementy, načež interaguje s DNA a alteruje genovou transkripci. Rovněž toxicita v rámci transdukce GPER je do značné míry diskutována a některé studie se zaměřují i na jednotlivé signální faktory. Je uváděn i možný crosstalk mezi ER, GPER a RTK systémy, což komplikuje vysvětlení přesných mechanismů toxicity BPA. Ukazuje se, že pravděpodobně ovlivňuje i  $Ca^{2+}$  kanál zasáhnutím do PKC a PKA systému či aktivací Erk. Některé receptory ale stále zůstávají neprostudovány, např. stimulace PR není dosud s jistotou popsána, ačkoliv

byly po expozici pozorovány výrazné změny v exprimaci PR. Nově se také studují účinky BPA na systémy PXR, GR a PPAR $\gamma$ . Zejména PPAR $\gamma$  je díky své lipogenní aktivitě spojován s nárůstem dětské obezity, za čímž by mohla stát i zvýšená exprese po expozici BPA. Otázkou zůstává i role BPA v epigenезi a stimulaci oxidativního stresu. Již po dvou dnech byla zdokumentována výrazná hypermethylace spermatocytů a v případě oxidativního stresu byly pozorovány změny v mozku, ledvinách, játrech a varlatech po 5 dnech administrace. BPA způsobuje nárůst oxidativních faktorů, ale potlačuje i funkci antioxidantů napříč tkáněmi. Nejcitlivější vůči vystavení BPA se zdá být reprodukční systém, kde BPA působí na více úrovních. Zdokumentovány jsou morfologické změny, disrupce HPG osy, ale i narušení vývoje germinálních buněk. Nejvyšší riziko vystavení BPA představuje pro těhotné a kojící matky, u kterých se prokázala přítomnost BPA v plodové vodě, pupečnickové krvi i placentě, načež u plodu dochází k nepřímé expozici během perinatálního vývoje. Vysoké koncentrace BPA naměřené v orgánech plodu modelu *Macaca fuscata* a *Mus musculus* poukazují na výraznější akumulaci u plodu než je tomu u dospělých jedinců. Expozice BPA byla prokázána i během laktace prostřednictvím mateřského mléka, ale i uvolňováním z kojeneckých lahví. Zákaz prodeje kojeneckých lahví s obsahem BPA již do funkce uvedla EU, Kanada i USA, některé země doporučily snížení obsahu BPA pro nádoby určené kojencům, ale zbytek zemí nezavedl žádné regulace. Existuje množství studií popisujících škodlivé účinky BPA na vývoj, a z toho důvodu je doporučováno se expozici BPA vyvarovat, například používáním skleněných lahví. Vzhledem k rostoucím důkazům uvádějícím endokrinní aktivitu BPA se hledají nové alternativy, které by jej mohly nahradit. Substituce jeho analogy se však podle studií zdá být kontraproduktivní vzhledem ke stejné nebo vyšší toxicitě. Zároveň by bylo zapotřebí prozkoumat, zda nedochází k synergickému efektu mezi jednotlivými analogy. Výběr biologického modelu rovněž hraje velkou roli při stanovení disruptčních účinků BPA. Výsledky studií se liší u hlodavců, primátů a samozřejmě i u lidí. Například u PXR byly pozorovány značné rozdíly mezi animálními a humanizovanými receptory naznačující odlišný efekt BPA mezi organismy, a proto je do budoucna potřeba extrapolace zvířecích studií na lidský organismus. Dále je potřeba identifikovat vztah BPA k aktivitě GPER u konkrétních typů buněk pro lepší zmapování toxické aktivity v rámci endokrinních tkání. Ve vztahu ke koncentraci používané při experimentech je zároveň potřeba rozlišit molekulární mechanismy okamžitého a chronického účinku BPA a stanovit charakter působení popisující křivku do tvaru U, kdy se efekt u nízkých a vysokých dávek výrazně odlišuje od středních dávek. Z výše uvedeného vyplývá, že v oblasti studia toxicity, i přes velké množství již existujících dosavadních poznatků, přetrvává stále mnoho neznámého a ve výzkumech mechanismů BPA je potřeba nadále pokračovat.

## 9 Seznam literatury

\* - sekundární citace

- [1] Allard, P., Monica P. Colaiácovo, M. P. (2011). Chapter 50 - Bisphenol A, Editor(s): Ramesh C. Gupta, Reproductive and Developmental Toxicology. Academic Press, 2011, 673–686.
- [2] Li, L., Wang, Q., Zhang, Y., Niu, Y., Yao, X., & Liu, H. (2015). The Molecular Mechanism of Bisphenol A (BPA) as an Endocrine Disruptor by Interacting with Nuclear Receptors: Insights from Molecular Dynamics (MD) Simulations. PLOS ONE, 10(3), 1–18.
- [3] Steinmetz, Rosemary, Brown, Nancy, Allen, Donald, Bigsby, Robert, Ben-Jonathan, Nira. (1997). The Environmental Estrogen Bisphenol A Stimulates Prolactin Release in Vitro and in Vivo 1. Endocrinology, 138, 1780–6.
- [4] Rahimi, Azam, and Satwa Farhangzadeh. (2001) Kinetics study of bisphenol A synthesis by condensation reaction. Iranian Polymer Journal, 10(1), 29–32.
- [5] Singh A. (2015) Polycarbonate Synthesis. In: Kobayashi S., Müllen K. (eds) Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials, 3, 1–5.
- [6] Fukuoka, S., Tojo, M., Hachiya, H. et al. (2007). Green and Sustainable Chemistry in Practice: Development and Industrialization of a Novel Process for Polycarbonate Production from CO<sub>2</sub> without Using Phosgene. Polymer Journal, 39, 91–114.
- [7] Cao, P., Zhong, H., Qiu, K., Li, D., Wu, G., Sui, H., & Song, Y. (2020). Exposure to bisphenol a and its substitutes, bisphenol F and bisphenol S from canned foods and beverages on Chinese market. Food Control, 120, 1–8.
- [8] Almeida, S., Raposo, A., Almeida-González, M. and Carrascosa, C. (2018), Bisphenol A: Food Exposure and Impact on Human Health. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 17, 1503–1517.
- [9] López-Cervantes, J., & Paseiro-Losada, P. (2003). Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. Food Additives and Contaminants, 20(6), 596–606.
- [10] Lee, H.R., Hwang, K.A., Park, M.A., Yi, B.R., Jeung, E.B., Choi, K.C. (2012). Treatment with bisphenol A and methoxychlor results in the growth of human breast cancer cells and alteration of the expression of cell cycle-related genes, cyclin D1 and p21, via an estrogen receptor-dependent signaling pathway. International Journal of Molecular Medicine, 29(5), 883-90.

- [11] Chao, H.-H., Zhang, X.-F., Chen, B., Pan, B., Zhang, L.-J., Li, L., Shen, W. (2011). Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the estrogen receptor signaling pathway. *Histochemistry and Cell Biology*, 137(2), 249–259.
- \*[12] Hewitt, S. C., & Korach, K. S. (2002). *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 3(3), 193–200.
- [13] Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G., & Muyan, M. (2016). Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(1), 4–20.
- [14] Hiroi, H., Tsutsumi, O., Mameda, M., Takai, Y., Osuga, Y., & Taketani, Y. (1999). Differential Interactions of Bisphenol A and 17.BETA.-estradiol with Estrogen Receptor ALPHA.(ER.ALPHA.) and ER.BETA. *Endocrine Journal*, 46(6), 773–778.
- [15] Kuiper, G. G. J. M., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., Gustafsson, J.-Å. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor  $\beta$ . *Endocrinology*, 139(10), 4252–4263.
- [16] Koneva, L. A., Vyas, A. K., McEachin, R. C., Puttabyatappa, M., Wang, H.-S., Sartor, M. A., & Padmanabhan, V. (2017). Developmental programming: Interaction between prenatal BPA and postnatal overfeeding on cardiac tissue gene expression in female sheep. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(1), 4–18.
- [17] Huang, B., Jiang, C., Luo, J., Cui, Y., Qin, L., & Liu, J. (2014). Maternal exposure to bisphenol A may increase the risks of Parkinson's disease through down-regulation of fetal IGF-1 expression. *Medical Hypotheses*, 82(3), 245–249.
- [18] Steinmetz, R., Mitchner, N. A., Grant, A., Allen, D. L., Bigsby, R. M., & Ben-Jonathan, N. (1998). The Xenoestrogen Bisphenol A Induces Growth, Differentiation, and c-fos Gene Expression in the Female Reproductive Tract1. *Endocrinology*, 139(6), 2741–2747.
- [19] Shen Y, Lu Q, Zhang P, Wu Y, Ren M. (2018). The effect of TGF- $\beta$  signaling on regulating proliferation of uterine leiomyoma cell via ER $\alpha$  signaling activated by bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(2), 276-81.
- [20] Doshi, T., D'Souza, C., Dighe, V., & Vanage, G. (2012). Effect of neonatal exposure on male rats to bisphenol a on the expression of DNA methylation machinery in the postimplantation embryo. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 26(9), 337–343.
- [21] Pham, T., Lecomte, S., Efstathiou, T., Ferriere, F., & Pakdel, F. (2019). An Update on the Effects of Glyceollins on Human Health: Possible Anticancer Effects and Underlying Mechanisms. *Nutrients*, 11(1), 79.



- [22] Hamilton, K. J., Arao, Y., & Korach, K. S. (2014). Estrogen hormone physiology: Reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. *Reproductive Biology*, 14(1), 3–8.
- [23] Hewitt, S. C., Winuthayanon, W., & Korach, K. S. (2015). What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. *Journal of Molecular Endocrinology*, 56(2), 55–71.
- [24] Giguère, V. (2002). To ERR in the estrogen pathway. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13(5), 220–225.
- [25] Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X., Okada, H., Matsushima, A., & Shimohigashi, Y. (2006). Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) with high constitutive activity. *Toxicology Letters*, 167(2), 95–105.
- [26] Zhang, X.-L., Liu, N., Weng, S.-F., & Wang, H.-S. (2016). Bisphenol A Increases the Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells via Oestrogen-related Receptor Gamma. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 119(4), 389–395.
- [27] Matsushima, A., Kakuta, Y., Teramoto, T., Koshiba, T., Liu, X., Okada, H., Shimohigashi, Y. (2007). Structural Evidence for Endocrine Disruptor Bisphenol A Binding to Human Nuclear Receptor ERR. *Journal of Biochemistry*, 142(4), 517–524.
- [28] Liu, X., Matsushima, A., Shimohigashi, M., & Shimohigashi, Y. (2014). A Characteristic Back Support Structure in the Bisphenol A-Binding Pocket in the Human Nuclear Receptor ERR $\gamma$ . *PLoS ONE*, 9(6), 1–12.
- [29] Liu, X., Matsushima, A., Shimohigashi, M., Shimohigashi, Y. (2014). A Characteristic Back Support Structure in the Bisphenol A-Binding Pocket in the Human Nuclear Receptor ERR $\gamma$ . *PLoS ONE* 9(6), 1–12.
- [30] Suyama, K., Kaneko, S., Kesamaru, H., Liu, X., Matsushima, A., Kakuta, Y., Okubo, T., Kasatani, K., & Nose, T. (2020). Evaluation of the Influence of Halogenation on the Binding of Bisphenol A to the Estrogen-Related Receptor  $\gamma$ . *Chemical Research in Toxicology*, 33(4), 889–902.
- [31] Shi, Y.-B. (2009). Dual Functions of Thyroid Hormone Receptors in Vertebrate Development: The Roles of Histone-Modifying Cofactor Complexes. *Thyroid*, 19(9), 987–999.
- \*[32] Cheng, S.-Y., Leonard, J. L., & Davis, P. J. (2010). Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. *Endocrine Reviews*, 31(2), 139–170.
- [33] Zhang, J., & Lazar, M. A. (2000). The Mechanism of Action of Thyroid Hormones. *Annual Review of Physiology*, 62(1), 439–466.
- [34] Bakker, O.. (2004). Thyroid Hormone Receptors. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, 1, 490–495.

- [35] Murk, A. J., Rijntjes, E., Blaauboer, B. J., Clewell, R., Crofton, K. M., Dingemans, M. M. L., Gutleb, A. C. (2013). Mechanism-based testing strategy using in vitro approaches for identification of thyroid hormone disrupting chemicals. *Toxicology in Vitro*, 27(4), 1320–1346.
- [36] Zhang, Y.-F., Ren, X.-M., Li, Y.-Y., Yao, X.-F., Li, C.-H., Qin, Z.-F., & Guo, L.-H. (2018). Bisphenol A alternatives bisphenol S and bisphenol F interfere with thyroid hormone signaling pathway in vitro and in vivo. *Environmental Pollution*, 237, 1072–1079.
- [37] Beg, M. A., & Sheikh, I. A. (2020). Endocrine disruption: Molecular interactions of environmental bisphenol contaminants with thyroid hormone receptor and thyroxine-binding globulin. *Toxicology and Industrial Health*, 20(10), 1–14.
- [38] Freitas, J., Cano, P., Craig-Veit, C., Goodson, M. L., David Furlow, J., & Murk, A. J. (2011). Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay. *Toxicology in Vitro*, 25(1), 257–266.
- [39] Ramakrishnan, S., & Wayne, N. L. (2008). Impact of bisphenol-A on early embryonic development and reproductive maturation. *Reproductive Toxicology*, 25(2), 177–183.
- [40] Heimeier, R. A., Das, B., Buchholz, D. R., & Shi, Y.-B. (2009). The Xenoestrogen Bisphenol A Inhibits Postembryonic Vertebrate Development by Antagonizing Gene Regulation by Thyroid Hormone. *Endocrinology*, 150(6), 2964–2973.
- [41] Lee, S., Kim, C., Shin, H., Kho, Y., & Choi, K. (2019). Comparison of thyroid hormone disruption potentials by bisphenols A, S, F, and Z in embryo-larval zebrafish. *Chemosphere*, 221, 115–123.
- [42] Gelmann, E. P. (2002). Molecular Biology of the Androgen Receptor. *Journal of Clinical Oncology*, 20(13), 3001–3015.
- [43] Huang, X., Cang, X., & Liu, J. (2019). Molecular mechanism of Bisphenol A on androgen receptor antagonism. *Toxicology in Vitro*, 61, 1–8.
- [44] McPhaul, M. J., Marcelli, M., Zoppi, S., Griffin, J. E., and Wilson, J. D. (1993). Genetic basis of endocrine disease 4: The spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 76, 17–23.
- \*[45] Lu, N. Z., Wardell, S. E., Burnstein, K. L., Defranco, D., Fuller, P. J., Giguere, V., Cidlowski, J. A. (2006). International Union of Pharmacology. LXV. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Glucocorticoid, Mineralocorticoid, Progesterone, and Androgen Receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 782–797.
- \*[46] Wang, R.-S., Yeh, S., Tzeng, C.-R., & Chang, C. (2009). Androgen Receptor Roles in Spermatogenesis and Fertility: Lessons from Testicular Cell-Specific Androgen Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews*, 30(2), 119–132.

- [47] Qiu, L.-L., Wang, X., Zhang, X., Zhang, Z., Gu, J., Liu, L., Wang, S.-L. (2013). Decreased androgen receptor expression may contribute to spermatogenesis failure in rats exposed to low concentration of bisphenol A. *Toxicology Letters*, 219(2), 116–124.
- [48] Teng, C., Goodwin, B., Shockley, K., Xia, M., Huang, R., Norris, J., Tice, R. R. (2013). Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*, 203(3), 556–564.
- [49] Lee, H. J. (2003). Antiandrogenic Effects of Bisphenol A and Nonylphenol on the Function of Androgen Receptor. *Toxicological Sciences*, 75(1), 40–46.
- [50] Pelch, K. E., Li, Y., Perera, L., Thayer, K. A., & Korach, K. S. (2019). Characterization of Estrogenic and Androgenic Activities for Bisphenol A-like Chemicals (BPs): In Vitro Estrogen and Androgen Receptors Transcriptional Activation, Gene Regulation, and Binding Profiles. *Toxicological Sciences*, 172(1), 23–37.
- [51] Wang, H., Ding, Z., Shi, Q.-M., Ge, X., Wang, H.-X., Li, M.-X., Xu, L.-C. (2017). Anti-androgenic mechanisms of Bisphenol A involve androgen receptor signaling pathway. *Toxicology*, 387, 10–16.
- [52] Wetendorf, M., & DeMayo, F. J. (2014). Progesterone receptor signaling in the initiation of pregnancy and preservation of a healthy uterus. *The International Journal of Developmental Biology*, 58(2-3-4), 95–106.
- [53] Fahrenkopf, A., Christine K. Wagner, C., K., (2020). Bisphenol A (BPA) induces progesterone receptor expression in an estrogen receptor  $\alpha$ -dependent manner in perinatal brain. *Neurotoxicology and Teratology*, 78, 1–5.
- [54] Aldad, T. S., Rahmani, N., Leranath, C., & Taylor, H. S. (2011). Bisphenol-A exposure alters endometrial progesterone receptor expression in the nonhuman primate. *Fertility and Sterility*, 96(1), 175–179.
- [55] Ayyanan, A., Laribi, O., Schuepbach-Mallepell, S., Schrick, C., Gutierrez, M., Tanos, T., Briskin, C. (2011). Perinatal Exposure to Bisphenol A Increases Adult Mammary Gland Progesterone Response and Cell Number. *Molecular Endocrinology*, 25(11), 1915–1923.
- [56] Funabashi, T., Kawaguchi, M., & Kimura, F. (2001). The Endocrine Disrupters Butyl Benzyl Phthalate and Bisphenol A Increase the Expression of Progesterone Receptor Messenger Ribonucleic Acid in the Preoptic Area of Adult Ovariectomized Rats. *Neuroendocrinology*, 74(2), 77–81.
- [57] Funabashi, T., Nakamura, T. J., & Kimura, F. (2004). p-Nonylphenol, 4-tert-Octylphenol and Bisphenol A Increase the Expression of Progesterone Receptor mRNA in the Frontal Cortex of Adult Ovariectomized Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 16(2), 99–104.

- [58] Jenkins, S., Raghuraman, N., Eltoum, I., Carpenter, M., Russo, J., & Lamartiniere, C. A. (2009). Oral Exposure to Bisphenol A Increases Dimethylbenzanthracene-Induced Mammary Cancer in Rats. *Environmental Health Perspectives*, 117(6), 910–915.
- [59] Berger, R. G., Foster, W. G., & deCatanzaro, D. (2010). Bisphenol-A exposure during the period of blastocyst implantation alters uterine morphology and perturbs measures of estrogen and progesterone receptor expression in mice. *Reproductive Toxicology*, 30(3), 393–400.
- \*[60] Kliewer, S. A., Goodwin, B., & Willson, T. M. (2002). The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism. *Endocrine Reviews*, 23(5), 687–702.
- \*[61] P.B. Danielson, B. S. P. (2002). The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Current Drug Metabolism*, 3(6), 561–597.
- [62] Sui, Y., Ai, N., Park, S.-H., Rios-Pilier, J., Perkins, J. T., Welsh, W. J., & Zhou, C. (2012). Bisphenol A and Its Analogues Activate Human Pregnane X Receptor. *Environmental Health Perspectives*, 120(3), 399–405.
- [63] Hanioka, N., Jinno, H., Nishimura, T., & Ando, M. (1998). Suppression of male-specific cytochrome P450 isoforms by bisphenol A in rat liver. *Archives of Toxicology*, 72(7), 387–394.
- [64] Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T., & Ando, M. (2000). Interaction of bisphenol A with rat hepatic cytochrome P450 enzymes. *Chemosphere*, 41(7), 973–978.
- [65] Sui, Y., Park, S.-H., Wang, F., & Zhou, C. (2018). Perinatal Bisphenol A Exposure Increases Atherosclerosis in Adult Male PXR-Humanized Mice. *Endocrinology*, 159(4), 1595–1608.
- [66] Prasanth, G.K., Divya, L.M. and Sadasivan, C. (2010). Bisphenol-A can bind to human glucocorticoid receptor as an agonist: an in silico study. *Journal of Applied Toxicology*, 30, 769–774.
- [67] Kojima, H., Takeuchi, S., Sanoh, S., Okuda, K., Kitamura, S., Uramaru, N., Sugihara, K., Yoshinari, K. (2018). Profiling of bisphenol A and eight its analogues on transcriptional activity via human nuclear receptors, *Toxicology*, 413, 48–55.
- [68] Poimenova, A., Markaki, E., Rahiotis, C., & Kitraki, E. (2010). Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol A. *Neuroscience*, 167(3), 741–749.
- [69] Sargis, R.M., Johnson, D.N., Choudhury, R.A. and Brady, M.J. (2010). Environmental Endocrine Disruptors Promote Adipogenesis in the 3T3-L1 Cell Line through Glucocorticoid Receptor Activation. *Obesity*, 18, 1283–1288.
- [70] Chen, X., Li, Y., Zhu, M., & Qin, Z. (2018). An ex vivo assay for screening glucocorticoid signaling disruption based on glucocorticoid-response gene transcription in *Xenopus* tails. *Journal of Environmental Sciences*, 66, 104–112.

- [71] Sarjeant, K., & Stephens, J. M. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), 1–20.
- [72] Somm, E., Schwitzgebel, V. M., Toulotte, A., Cederroth, C. R., Combescure, C., Nef, S., Hüppi, P. S. (2009). Perinatal Exposure to Bisphenol A Alters Early Adipogenesis in the Rat. *Environmental Health Perspectives*, 117(10), 1549–1555.
- [73] Ahmed, S., Atlas, E. (2016). Bisphenol S- and bisphenol A-induced adipogenesis of murine preadipocytes occurs through direct peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *International Journal of Obesity*, 40, 1566–1573.
- [74] Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Nigro, C., Oriente, F., Formisano, P., Beguinot, F. (2020). Low-dose Bisphenol-A Promotes Epigenetic Changes at Ppar $\gamma$  Promoter in Adipose Precursor Cells. *Nutrients*, 12(11), 3498.
- [75] Revankar, C. M. (2005). A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science*, 307(5715), 1625–1630.
- [76] Hall, J. M., Couse, J. F., & Korach, K. S. (2001). The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 36869–36872.
- [77] Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., & Sklar, L. A. (2007). GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265-266, 138–142.
- [78] Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2014). Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 389(1-2), 71–83.
- [79] Thomas, P., & Dong, J. (2006). Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 102(1-5), 175–179.
- \*[80] Xu, Z.-X., Liu, J., Gu, L.-P., Huang, B., & Pan, X.-J. (2017). Biological effects of xenoestrogens and the functional mechanisms via genomic and nongenomic pathways. *Environmental Reviews*, 25(3), 306–322.
- [81] Wang, W., Wang, J., Wang, Q., Wu, W., Huan, F., & Xiao, H. (2013). Bisphenol A Modulates Calcium Currents and Intracellular Calcium Concentration in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *The Journal of Membrane Biology*, 246(5), 391–397.
- [82] Wu, D., Wu, F., Lin, R., Meng, Y., Wei, W., Sun, Q., & Jia, L. (2020). Impairment of learning and memory induced by perinatal exposure to BPA is associated with ER $\alpha$ -mediated alterations of synaptic plasticity and PKC/ERK/CREB signaling pathway in offspring rats. *Brain Research Bulletin*, 161, 43–54.

- [83] Wang C., Zhang J., Li Q., Zhang T., Deng Z., Lian J., Jia D., Li R., Zheng T., Ding X., Yang F., Ma C., Wang R., et al. (2017). Low concentration of BPA induces mice spermatocytes apoptosis via GPR30. *Oncotarget*, 8, 49005–49015.
- [84] Zhang, K.-S., Chen, H.-Q., Chen, Y.-S., Qiu, K.-F., Zheng, X.-B., Li, G.-C., Wen, C.-J. (2014). Bisphenol A stimulates human lung cancer cell migration via upregulation of matrix metalloproteinases by GPER/EGFR/ERK1/2 signal pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(8), 1037–1043.
- [85] Ge, L.-C., Chen, Z.-J., Liu, H.-Y., Zhang, K.-S., Liu, H., Huang, H.-B., Wang, H.-S. (2014). Involvement of activating ERK1/2 through G protein coupled receptor 30 and estrogen receptor  $\alpha/\beta$  in low doses of bisphenol A promoting growth of Sertoli TM4 cells. *Toxicology Letters*, 226(1), 81–89.
- [86] Gao F, Huang Y, Zhang L, Liu W. (2019). Involvement of estrogen receptor and GPER in bisphenol A induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Toxicology In Vitro*, 56, 156–162.
- [87] Wang, C., Fu, W., Quan, C., Yan, M., Liu, C., Qi, S., & Yang, K. (2014). The role of Pten/Akt signaling pathway involved in BPA-induced apoptosis of rat sertoli cells. *Environmental Toxicology*, 30(7), 793–802.
- [88] Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*, 128(4), 635–638.
- [89] Wang, Y., & Leung, F. C. C. (2004). An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics*, 20(7), 1170–1177.
- [90] Yin, L., Dai, Y., Jiang, X., Liu, Y., Chen, H., Han, F., Liu, J. (2016). Role of DNA methylation in bisphenol A exposed mouse spermatocyte. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 265–271.
- [91] Senyildiz, M., Karaman, E. F., Bas, S. S., Pirincci, P. A., & Ozden, S. (2017). Effects of BPA on global DNA methylation and global histone 3 lysine modifications in SH-SY5Y cells: An epigenetic mechanism linking the regulation of chromatin modifying genes. *Toxicology in Vitro*, 44, 313–321.
- [92] Faulk, C., Kim, J. H., Jones, T. R., McEachin, R. C., Nahar, M. S., Dolinoy, D. C., & Sartor, M. A. (2015). Bisphenol A-associated alterations in genome-wide DNA methylation and gene expression patterns reveal sequence-dependent and non-monotonic effects in human fetal liver. *Environmental Epigenetics*, 1(1), 1–11.
- [93] Adjakly, M., Ngollo, M., Lebert, A., Dagdemir, A., Penault-Llorca, F., Boiteux, J.-P., Bernard-Gallon, D. (2014). Comparative Effects of Soy Phytoestrogens and 17 $\beta$ -Estradiol on DNA Methylation of a Panel of 24 Genes in Prostate Cancer Cell Lines. *Nutrition and Cancer*, 66(3), 474–482.

- \*[94] Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., Sak, K., Sethi, G. (2019). Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules*, 9(11), 735.
- \*[95] Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*, 2014, 1–19.
- \*[96] Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42, 132–155.
- [97] Kobayashi, K., Liu, Y., Ichikawa, H., Takemura, S., & Minamiyama, Y. (2020). Effects of Bisphenol A on Oxidative Stress in the Rat Brain. *Antioxidants*, 9(3), 240.
- [98] Meng, Z., Tian, S., Yan, J., Jia, M., Yan, S., Li, R., Zhang, R., Zhu, W., Zhou, Z. (2019). Effects of perinatal exposure to BPA, BPF and BPAF on liver function in male mouse offspring involving in oxidative damage and metabolic disorder. *Environmental Pollution*, 247, 935–943.
- [99] Gharibi, Soraya, Dilmaghanian, Aydin, Sadighara, Parisa, Fard, Ramin, Erfanmanesh, Ahamd, Mohajerfar, Tahereh, Farkhondeh, Tahereh. (2013). The Effect of Bisphenol A on Oxidative Stress Indices and Pathological Changes in the Brain of Chicken Embryos. *World Applied Sciences Journal*, 26, 345–351.
- [100] Kabuto, H., Hasuike, S., Minagawa, N., & Shishibori, T. (2003). Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environmental Research*, 93(1), 31–35.
- [101] Delgobo, M., Agnes, J. P., Gonçalves, R. M., Santos, V. W., Parisotto, E. B., Zamoner, A., Zanotto-Filho, A. (2019). N-acetylcysteine and alpha-lipoic acid improve antioxidant defenses and decrease oxidative stress, inflammation and serum lipid levels in ovariectomized rats via estrogen-independent mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 67, 190–200.
- [102] Miricescu, D., Totan, A., Stanescu, I.I., Didilescu, A., Sfeatcu, R., Stanescu, A.M.A., Stefani3, C., Greabu, M. (2019). Antioxidant Activity of Entrapped alfa-tocopherol and Lutein in PLGA Nanoparticles in Wistar Rats, *Mater. Plast.*, 56(3) 520–534.
- [103] Avci, B., Bahadir, A., Tuncel, O. K., & Bilgici, B. (2014). Influence of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -lipoic acid on bisphenol-A-induced oxidative damage in liver and ovarian tissue of rats. *Toxicology and Industrial Health*, 32(8), 1381–1390.
- [104] Sun, Y., Wang, X., Zhou, Y., Zhang, J., Cui, W., Wang, E., Xu, X. (2021). Protective effect of metformin on BPA-induced liver toxicity in rats through upregulation of cystathionine  $\beta$  synthase and cystathionine  $\gamma$  lyase expression. *Science of The Total Environment*, 750, 1–10.

- [105] Elswefy, S. E.-S., Abdallah, F. R., Atteia, H. H., Wahba, A. S., & Hasan, R. A. (2016). Inflammation, oxidative stress and apoptosis cascade implications in bisphenol A-induced liver fibrosis in male rats. *International Journal of Experimental Pathology*, 97(5), 369–379.
- [106] Piao, X., Liu, Z., Li, Y., Yao, D., Sun, L., Wang, B., Zhang, Y. (2019). Investigation of the effect for bisphenol A on oxidative stress in human hepatocytes and its interaction with catalase. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 221, 1–8.
- [107] Khan, S., Beigh, S., Chaudhari, B. P., Sharma, S., Aliul Hasan Abdi, S., Ahmad, S., Raisuddin, S. (2015). Mitochondrial dysfunction induced by Bisphenol A is a factor of its hepatotoxicity in rats. *Environmental Toxicology*, 31(12), 1922–1934.
- [108] Hu, F., Li, T., Gong, H., Chen, Z., Jin, Y., Xu, G., & Wang, M. (2017). Bisphenol A Impairs Synaptic Plasticity by Both Pre- and Postsynaptic Mechanisms. *Advanced Science*, 4(8), 1–11.
- [109] Palanza, P. L., Howdeshell, K. L., Parmigiani, S., & vom Saal, F. S. (2002). Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environmental Health Perspectives*, 110(3), 415–422.
- [110] Wolstenholme, J. T., Rissman, E. F., & Connelly, J. J. (2011). The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Hormones and Behavior*, 59(3), 296–305.
- [111] Xu, X., Dong, F., Yang, Y., Wang, Y., Wang, R., & Shen, X. (2015). Sex-specific effects of long-term exposure to bisphenol-A on anxiety- and depression-like behaviors in adult mice. *Chemosphere*, 120, 258–266.
- \*[112] Kalueff, A. V., & Nutt, D. J. (2007). Role of GABA in anxiety and depression. *Depression and Anxiety*, 24(7), 495–517.
- [113] Zhang, H., Kuang, H., Luo, Y., Liu, S., Meng, L., Pang, Q., & Fan, R. (2019). Low-dose bisphenol A exposure impairs learning and memory ability with alterations of neuromorphology and neurotransmitters in rats. *Science of The Total Environment*, 697, 1–11.
- [114] Wideman, C. E., Jardine, K. H., & Winters, B. D. (2018). Involvement of classical neurotransmitter systems in memory reconsolidation: Focus on destabilization. *Neurobiology of Learning and Memory*, 156, 68–79.
- [115] Zhong, X., Li, J., Zhuang, Z., Shen, Q., Jiang, K., Hu, Y., Xu, X. (2019). Rapid effect of bisphenol A on glutamate-induced Ca<sup>2+</sup> influx in hippocampal neurons of rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 485, 35–43.
- [116] Chen, X., Wang, Y., Xu, F., Wei, X., Zhang, J., Wang, C., Wang, Q. (2017). The Rapid Effect of Bisphenol-A on Long-Term Potentiation in Hippocampus Involves Estrogen Receptors and ERK Activation. *Neural Plasticity*, 2017, 1–9.



- [117] Takahashi, O., & Oishi, S. (2003). Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food and Chemical Toxicology*, 41(7), 1035–1044.
- [118] Ashby, J. (2003). The Effect on Sperm Production in Adult Sprague-Dawley Rats Exposed by Gavage to Bisphenol A between Postnatal Days 91-97. *Toxicological Sciences*, 74(1), 129–138.
- [119] Prins, G. S., Tang, W.-Y., Belmonte, J., & Ho, S.-M. (2008). Perinatal Exposure to Oestradiol and Bisphenol A Alters the Prostate Epigenome and Increases Susceptibility to Carcinogenesis. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 102(2), 134–138.
- [120] Derouiche, S., Warnier, M., Mariot, P., Gosset, P., Mauroy, B., Bonnal, J.-L., Roudbaraki, M. (2013). Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signalling. *SpringerPlus*, 2(1), 54.
- [121] Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F. J. R., & Schoenfelder, G. (2010). Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 118(8), 1055–1070.
- [122] Zhang, T., Sun, H., & Kannan, K. (2013). Blood and Urinary Bisphenol A Concentrations in Children, Adults, and Pregnant Women from China: Partitioning between Blood and Urine and Maternal and Fetal Cord Blood. *Environmental Science & Technology*, 47(9), 4686–4694.
- [123] Meeker, J. D., Ehrlich, S., Toth, T. L., Wright, D. L., Calafat, A. M., Trisini, A. T., Hauser, R. (2010). Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reproductive Toxicology*, 30(4), 532–539.
- [124] Al-Hiyasat, A. S., Darmani, H., & Elbetieha, A. M. (2002). Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *European Journal of Oral Sciences*, 110(2), 163–167.
- [125] Aikawa, H., Koyama, S., Matsuda, M., Nakahashi, K., Akazome, Y., & Mori, T. (2004). Relief effect of vitamin A on the decreased motility of sperm and the increased incidence of malformed sperm in mice exposed neonatally to bisphenol A. *Cell and Tissue Research*, 315(1), 119–124.
- [126] Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Shaheen, G., Rehman, H., Butt, M. A. (2018). Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere*, 209, 508–516.
- [127] Nakamura, D., Yanagiba, Y., Duan, Z., Ito, Y., Okamura, A., Asaeda, N., Zhang, S.-Y. (2010). Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicology Letters*, 194(1-2), 16–25.
- [128] Chen, L., Zhao, Y., Li, L., Xie, L., Chen, X., Liu, J., Ge, R.-S. (2018). Bisphenol A stimulates differentiation of rat stem Leydig cells in vivo and in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 474, 158–167.

- [129] Ge, L.-C., Chen, Z.-J., Liu, H., Zhang, K.-S., Su, Q., Ma, X.-Y., Wang, H.-S. (2014). Signaling related with biphasic effects of bisphenol A (BPA) on Sertoli cell proliferation: A comparative proteomic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(9), 2663–2673.
- [130] Iida, H., Maehara, K., Doiguchi, M., Mōri, T., & Yamada, F. (2003). Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells. *Reproductive Toxicology*, 17(4), 457–464.
- [131] Xi, W., Lee, C. K. F., Yeung, W. S. B., Giesy, J. P., Wong, M. H., Zhang, X., Wong, C. K. C. (2011). Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus–pituitary–gonadal axis of CD-1 mice. *Reproductive Toxicology*, 31(4), 409–417.
- [132] Ng, Y., Wolfe, A., Novaira, H. J., & Radovick, S. (2009). Estrogen regulation of gene expression in GnRH neurons. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 303(1-2), 25–33.
- [133] Klenke, U., Constantin, S., & Wray, S. (2016). BPA Directly Decreases GnRH Neuronal Activity via Noncanonical Pathway. *Endocrinology*, 157(5), 1980–1990.
- [134] Ruffinatti, F. A., Gilardino, A., Secchi, V., Cottone, E., Lovisolo, D., & Bovolin, P. (2019). Bisphenol A Activates Calcium Influx in Immortalized GnRH Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2160.
- [135] Adashi, E. Y. (1998). The IGF family and folliculogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*, 39(1-2), 13–19.
- [136] Hwang, K.-A., Park, M.-A., Kang, N.-H., Yi, B.-R., Hyun, S.-H., Jeung, E.-B., & Choi, K.-C. (2013). Anticancer effect of genistein on BG-1 ovarian cancer growth induced by 17  $\beta$ -estradiol or bisphenol A via the suppression of the crosstalk between estrogen receptor alpha and insulin-like growth factor-1 receptor signaling pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(3), 637–646.
- [137] Kwintkiewicz, J., Nishi, Y., Yanase, T., & Giudice, L. C. (2010). Peroxisome Proliferator–Activated Receptor- $\gamma$  Mediates Bisphenol A Inhibition of FSH-Stimulated IGF-1, Aromatase, and Estradiol in Human Granulosa Cells. *Environmental Health Perspectives*, 118(3), 400–406.
- [138] Yang, Y. J., Hong, Y.-C., Oh, S.-Y., Park, M.-S., Kim, H., Leem, J.-H., & Ha, E.-H. (2009). Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. *Environmental Research*, 109(6), 797–801.
- \*[139] Machtinger, R., & Orvieto, R. (2014). Bisphenol A, oocyte maturation, implantation, and IVF outcome: review of animal and human data. *Reproductive BioMedicine Online*, 29(4), 404–410.
- [140] Ehrlich, S., Williams, P. L., Missmer, S. A., Flaws, J. A., Ye, X., Calafat, A. M., Hauser, R. (2012). Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Human Reproduction*, 27(12), 3583–3592.

- [141] Mínguez-Alarcón, L., Gaskins, A. J., Chiu, Y.-H., Williams, P. L., Ehrlich, S., Chavarro, J. E., Hauser, R. (2015). Urinary bisphenol A concentrations and association within vitrofertilization outcomes among women from a fertility clinic. *Human Reproduction*, 30(9), 2120–2128.
- [142] Can, A., Semiz, O., & Cinar, O. (2005). Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 11(6), 389–396.
- [143] Hunt, P. A., Koehler, K. E., Susiarjo, M., Hodges, C. A., Ilagan, A., Voigt, R. C., Hassold, T. J. (2003). Bisphenol A Exposure Causes Meiotic Aneuploidy in the Female Mouse. *Current Biology*, 13(7), 546–553.
- [144] Brieno-Enriquez, M. A., Reig-Viader, R., Cabero, L., Toran, N., Martinez, F., Roig, I., & Garcia Caldes, M. (2011). Gene expression is altered after bisphenol A exposure in human fetal oocytes in vitro. *Molecular Human Reproduction*, 18(4), 171–183.
- [145] Zhu, X., Tian, G. G., Yu, B., Yang, Y., & Wu, J. (2018). Effects of bisphenol A on ovarian follicular development and female germline stem cells. *Archives of Toxicology*, 92(4), 1581–1591.
- [146] Zhou, W., Liu, J., Liao, L., Han, S., & Liu, J. (2008). Effect of bisphenol A on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 283(1-2), 12–18.
- [147] Tharp, A. P., Maffini, M. V., Hunt, P. A., VandeVoort, C. A., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2012). Bisphenol A alters the development of the rhesus monkey mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(21), 8190–8195.
- [148] Markey, C. M., Wadia, P. R., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2005). Long-Term Effects of Fetal Exposure to Low Doses of the Xenoestrogen Bisphenol-A in the Female Mouse Genital Tract1. *Biology of Reproduction*, 72(6), 1344–1351.
- [149] Schönfelder, G., Friedrich, K., Paul, M., & Chahoud, I. (2004). Developmental Effects of Prenatal Exposure to Bisphenol A on the Uterus of Rat Offspring. *Neoplasia*, 6(5), 584–594.
- [150] Hung, P., Van Winkle, L. S., Williams, C. J., Hunt, P. A., & VandeVoort, C. A. (2018). Prenatal Bisphenol A Exposure Alters Epithelial Cell Composition in the Rhesus Macaque Fetal Oviduct. *Toxicological Sciences*, 167(2), 450–457.
- [151] Yu, M., Xu, Y., Li, M., Li, D., Lu, Y., Yu, D., & Du, W. (2018). Bisphenol A accelerates meiotic progression in embryonic chickens via the estrogen receptor  $\beta$  signaling pathway. *General and Comparative Endocrinology*, 259, 66–75.

- [152] Song, X., Zhou, X., Yang, F., Liang, H., Wang, Z., Li, R., Yuan, W. (2020). Association between prenatal bisphenol a exposure and promoter hypermethylation of CAPS2, TNFRSF25, and HKR1 genes in cord blood. *Environmental Research*, 190, 1–8.
- [153] Zeng, Q., Chen, X., Ning, C., Zhu, Q., Yao, Y., Zhao, Y., & Luan, F. (2018). Methylation of the genes ROD1, NLRC5, and HKR1 is associated with aging in Hainan centenarians. *BMC Medical Genomics*, 11(7), 1–10.
- [154] Uchida, K., Suzuki, A., Kobayashi, Y., Buchanan, D. L., Sato, T., Watanabe, H., Iguchi, T. (2002). Bisphenol-A Administration during Pregnancy Results in Fetal Exposure in Mice and Monkeys. *Jornal of Health Science*, 48(6), 579–582.
- [155] Lorber, M., Schecter, A., Paepke, O., Shropshire, W., Christensen, K., & Birnbaum, L. (2015). Exposure assessment of adult intake of bisphenol A (BPA) with emphasis on canned food dietary exposures. *Environment International*, 77, 55–62.
- [156] Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y.-L., Wu, Y., & Widelka, M. (2016). Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity. *Environmental Science & Technology*, 50(11), 5438–5453.
- \*[157] Huang, Y. Q., Wong, C. K. C., Zheng, J. S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Wong, M. H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*, 42, 91–99.
- [158] Canesi, L., & Fabbri, E. (2015). Environmental Effects of BPA. *Dose-Response*, 13(3), 1–14.
- [159] Suzuki, T., Nakagawa, Y., Takano, I., Yaguchi, K., & Yasuda, K. (2004). Environmental Fate of Bisphenol A and Its Biological Metabolites in River Water and Their Xeno-estrogenic Activity. *Environmental Science & Technology*, 38(8), 2389–2396.
- [160] Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2007). Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(1), 39–44.
- [161] Becker, K., Güen, T., Seiwert, M., Conrad, A., Pick-Fuß, H., Müller, J., Kolossa-Gehring, M. (2009). GerES IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212(6), 685–692.
- [162] Zafra, A., del Olmo, M., Pulgar, R., Navalón, A., & Vilchez, J. L. (2002). Determination of bisphenol-a and related compounds in human saliva by gas chromatography—mass spectrometry. *Chromatographia*, 56(3-4), 213–218.
- [163] Biedermann, S., Tschudin, P., & Grob, K. (2010). Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(1), 571–576.

- [164] Lv, Y., Lu, S., Dai, Y., Rui, C., Wang, Y., Zhou, Y., Fan, R. (2017). Higher dermal exposure of cashiers to BPA and its association with DNA oxidative damage. *Environment International*, 98, 69–74.
- [165] Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 24(2), 139–177.
- [166] Nunez, A. A., Kannan, K., Giesy, J. P., Fang, J., & Clemens, L. G. (2001). Effects of Bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere*, 42(8), 917–922.
- [167] Desai, M., Ferrini, M., Jellyman, J., Han, G., & Ross, M. (2018). In vivo and in vitro bisphenol A exposure effects on adiposity. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 9(6), 678–687.
- [168] Braun, J. M., Li, N., Arbuckle, T. E., Dodds, L., Massarelli, I., Fraser, W. D., Muckle, G. (2019). Association between gestational urinary bisphenol a concentrations and adiposity in young children: The MIREC study. *Environmental Research*, 172, 454–461.
- [169] Hoepner, L. A., Whyatt, R. M., Widen, E. M., Hassoun, A., Oberfield, S. E., Mueller, N. T., Rundle, A. G. (2016). Bisphenol A and Adiposity in an Inner-City Birth Cohort. *Environmental Health Perspectives*, 124(10), 1644–1650.
- [170] Anna Mentor, Mimmi Wänn, Björn Brunström, Maria Jönsson, Anna Mattsson. (2020). Bisphenol AF and Bisphenol F Induce Similar Feminizing Effects in Chicken Embryo Testis as Bisphenol A. *Toxicological Sciences*, 178(2), 239–250.
- [171] Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Razak, S., Rauf, N., Mahboob, S. (2019). Prenatal BPA and its analogs BPB, BPF, and BPS exposure and reproductive axis function in the male offspring of Sprague Dawley rats. *Human & Experimental Toxicology*, 38(12), 1344–1365.
- [172] Mao, J., Jain, A., Denslow, N. D., Nouri, M.-Z., Chen, S., Wang, T., Rosenfeld, C. S. (2020). Bisphenol A and bisphenol S disruptions of the mouse placenta and potential effects on the placenta–brain axis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(9), 4642–4652.
- [173] Rosenmai, A. K., Dybdahl, M., Pedersen, M., Alice van Vugt-Lussenburg, B. M., Wedeby, E. B., Taxvig, C., & Vinggaard, A. M. (2014). Are Structural Analogues to Bisphenol A Safe Alternatives? *Toxicological Sciences*, 139(1), 35–47.
- [174] Cao, L.-Y., Ren, X.-M., Li, C.-H., Zhang, J., Qin, W.-P., Yang, Y., Guo, L.-H. (2017). Bisphenol AF and Bisphenol B Exert Higher Estrogenic Effects than Bisphenol A via G Protein-Coupled Estrogen Receptor Pathway. *Environmental Science & Technology*, 51(19), 11423–11430.
- [175] Ben-Jonathan, N., & Hugo, E. R. (2016). Bisphenols Come in Different Flavors: Is “S” Better Than “A”? *Endocrinology*, 157(4), 1321–1323.

## Internetové zdroje

[I] Polycarbonates. The Essential Chemical Industry - online [online]. 2017, 27th April n. 1. [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.essentialchemicalindustry.org/polymers/polycarbonates.html>.

[II] Rogers, Kara. Bisphenol A. Britannica [online]. Encyclopædia Britannica, 2020, March 12 [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/bisphenol-A>.

[III] Petr Nohel, Richard Rokyta, Václav Holeček, René Vlasák. Oxidační stres, jeho stanovení, nemoci jím způsobené a jeho snižování antioxidanty. Vesmír [online], Vesmír 90, 357, 2011, 9. 6., n. 1. [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2011/cislo-6/oxidacni-stres.html>.

[IV] Marques P, Skorupskaitė K, George JT, et al. Physiology of GnRH and Gonadotropin Secretion. NCBI [online]. South Dartmouth (MA), 2018, Jun 19 [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279070/>.

[V] STRA8 Gene: Stimulated By Retinoic Acid 8. Gene Cards: The human gene database [online]. [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STRA8>.

[VI] UniProtKB - Q92904 (DAZL\_HUMAN). UniProt [online]. [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q92904>.

[VII] TNFRSF25 Gene: TNF Receptor Superfamily Member 25. Gene Cards: The human gene database [online]. [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNFRSF25>.

[VIII] ZNF875 Gene: Zinc Finger Protein 875. Gene Cards: The human gene database [online]. [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZNF875>.

[IX] Fetální alkoholový syndrom. WikiSkripta [online]. 2018, 22. 11., n. 1. [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Fet%C3%A1ln%C3%AD\\_alkoholov%C3%BD\\_syndrom](https://www.wikiskripta.eu/w/Fet%C3%A1ln%C3%AD_alkoholov%C3%BD_syndrom)

[X] BPA update: working group to start reviewing new studies. Efsa: European Food Safety Authority [online]. 2018, 4 September n. 1. [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180904>.

[XI] Global Bisphenol A Market Report 2018: Analysis 2013-2017 & Forecasts 2018-2023. CISION: PR Newswire [online]. DUBLIN, 2018, Nov 29 [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-bisphenol-a-market-report-2018-analysis-2013-2017--forecasts-2018-2023-300757673.html>.

[XII] Bisphenol A. ECHA: European Chemicals Agency [online]. [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/hot-topics/bisphenol-a>.